



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Marko Z. Anđelković

**Optimizacija ekstrakcije i karakterizacija
fenolnih jedinjenja i bio ulja iz
sorti Vranac i Merlo (*Vitis vinifera* L.)
i njihova potencijalna primena**

Doktorska disertacija

Niš, 2015



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS



Marko Z. Anđelković

**Optimization of the extraction and
characterization of phenolic compounds and
bio-oils from Vranac and Merlot varieties
(*Vitis vinifera* L.) and their potential
application**

PhD thesis

Niš, 2015

Mentor:

dr Blaga Radovanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu
Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

dr Branislava Sivčev, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu
Univerziteta u Beogradu,

dr Goran Nikolić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Leskovcu
Univerziteta u Nišu,

dr Aleksandra Zarubica, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u
Nišu Univerziteta u Nišu,

dr Tatijana Mihajlov-Krstev, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta
u Nišu Univerziteta u Nišu.


Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija većim delom je rađena u laboratorijama Departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Radom je rukovodila dr Blaga Radovanović, redovni profesor PMF-a u Nišu kojoj se ovim putem zahvaljujem na pomoći, korisnim savetima i sugestijama u toku izrade i pisanja rada.

Zahvalnost dugujem profesorima dr Aleksandri Zarubici, dr Tatjani Mihajlov-Krstev, dr Branki Sivčev i dr Goranu Nikoliću na pomoći pri izradi i korisnim sugestijama u toku sređivanja rezultata.

Takođe se zahvaljujem svojoj porodici, na razumevanju, kao i svim kolegama i prijateljima na moralnoj podršci.

Autor

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ	
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА	
Редни број, РБР:		
Идентификациони број, ИБР:		
Тип документације, ТД:	монографска	
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички	
Врста рада, ВР:	докторска дисертација	
Аутор, АУ:	Марко З. Анђелковић	
Ментор, МН:	Блага Ц. Радовановић	
Наслов рада, НР:	Оптимизација екстракције и карактеризација фенолних једињења и био уља из сорти Вранац и Мерло (<i>Vitis vinifera</i> L.) и њихова потенцијална примена	
Језик публикације, ЈП:	српски	
Језик извода, ЈИ:	енглески	
Земља публиковања, ЗП:	Србија	
Уже географско подручје, УГП:	Србија	
Година, ГО:	2015.	
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт	
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.	
Физички опис рада, ФО:	11 поглавља; 209 страна; 238 цитат; 26 табела; 99 слике	
Научна област, НО:	хемија	
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија	
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Вранац, Мерло, фенолна једињења, антиоксидативна, антимицробна активност, био уље, биодизел, HPLC, UV-VIS, GC-MS, ¹ H NMR.	
УДК	634.863 : 66.061.3 634.863 : 547.56 634.863 : 621.892.3	
Чува се, ЧУ:	библиотека	
Важна напомена, ВН:		

Извод, ИЗ:	У овој докторској дисертацији извршена је оптимизација конвенционалне и ултразвучне екстракционе технике са циљем добијања биолошки активних фенолних једињења из свих делова винове лозе, као и споредних производа грожђа сорти Вранац и Мерло. Фенолни садржај добијених екстраката анализиран је UV-Vis спектроскопским методама и HPLC анализом. Утврђена је значајна антиоксидативна и антимикуробна активност код свих испитиваних екстраката. У циљу примене отпадних биоактивних делова, насталих прерадом грожђа, извршена је екстракција био уља из семенки и комине, чији је састав потврђен GC-MS анализом. Даље је извршена потпуна конверзија био уља у биодизел што је потврђено ¹ H NMR методом. На основу добијених резултата може се закључити да сви делови винове лозе могу наћи примену у прехранбеној индустрији, фармацији и енергетици.
Датум прихватања теме, ДП:	08.07.2014.
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, КО:	Предс Члан: Члан,

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
KEY WORDS DOCUMENTATION	
Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Marko Z. Anđelković
Mentor, MN :	Blaga C. Radovanović
Title, TI :	Optimization of the extraction and characterization of phenolic compounds and bio-oils from Vranac and Merlot varieties (<i>Vitis vinifera</i> L.) and their potential application
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2015
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	11 chapters/ 209 pages/ 238 ref./ 26 tables/ 99 pictures
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Vranac, Merlo, phenolic compounds, antioxidant, antimicrobial activity, био уље, биодизел, HPLC, UV-VIS, GC-MS, ¹ H NMR.
UC	634.863 : 66.061.3 634.863 : 547.56 634.863 : 621.892.3
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, AB :	<p>In this doctoral dissertation we optimized conventional and ultrasonic extraction techniques with the aim of obtaining biologically active phenolic compounds in all grapevine parts and grape by-products of two varieties Vranac and Merlo. Phenolic content of the obtained extracts were subjected to UV-Vis and HPLC analyzes. The significant antioxidant and antimicrobial activity was confirmed. The bio-oil extraction from seeds and pomace was performed with the aim to use the biactive waste parts that are generated after processing of grapes. The composition of the bio-oils was determined by GC-MS analysis. Further, it was carried out full conversion (100%) of bio-oil into biodiesel, which was confirmed by ¹H NMR method. Based on the obtained results we can conclude that all grapevine parts can find broad application in the food industry and also in pharmaceutical and energetic field.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	<p>President:</p> <hr/> <p>Member:</p> <hr/> <p>Member,</p>

Образац Q4.09.13 - Издање 1

SADRŽAJ

SADRŽAJ	1
SKRAĆENICE	6
1. UVOD	9
2. OPŠTI DEO	12
2.1. VINOVA LOZA	13
2.1.1. Osnovne botaničke karakteristike vinove loze (<i>Vitis vinifera</i> L.)	13
2.1.2. Hemijski sastav vinove loze	15
2.2. FENOLNA JEDINJENJA VINOVE LOZE	19
2.2.1. Fenolne kiseline	19
2.2.2. Flavonoli	21
2.2.3. Flavan-3-oli	22
2.2.4. Antocijani	26
2.2.5. Stilbeni	29
2.3. PROMENE HEMIJSKOG SASTAVA GROŽĐANIH BOBICA TOKOM ZRENJA GROŽĐA ..	30
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH JEDINJENJA IZ VINOVE LOZE	34
2.4.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno	35
2.4.2. Superkritična fluid ekstrakcija (SFE)	36
2.4.3. Ubrzana ekstrakcija rastvaračem	38
2.4.4. Ultrazvučna ekstrakcija (UE)	39
2.4.5. Mikrotalasna ekstrakcija (MAE)	40
2.5. EKSTRAKCIJA ULJA IZ SEMENKI GROŽĐA	42
2.6. ANALIZA FENOLNIH JEDINJENJA IZ VINOVE LOZE	42
2.7. ANALIZA ULJA IZ SEMENKI GROŽĐA	44
2.8. UPOTREBA VINOVE LOZE U TRADICIONALNOJ MEDICINI	44
2.9. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI RAZLIČITIH ORGANA VINOVE LOZE	45
2.9.1. Antioksidativna aktivnost	45
2.9.2. Kardiozaštitna aktivnost	47
2.9.3. Antikancerogena aktivnost	48
2.9.4. Antizapaljenska aktivnost	48
2.9.5. Aktivnost u sprečavanju starenja	49
2.9.6. Antimikrobna aktivnost	49
3. EKSPERIMENTALNI DEO	50

3.1. MATERIJALI.....	51
3.2. APARATI.....	53
3.3. HEMIKALIJE I REAGENSI.....	54
3.4. PRIPREMA UZORAKA.....	55
3.4.1. Konvencijalna ekstrakcija (KE).....	55
3.4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UE).....	56
3.4.3. Ekstrakcija bio ulja iz semenki grozđa i komine.....	56
3.4.4. Transesterifikacija ulja semenki i komine.....	56
3.5. ANALIZA UZORAKA.....	57
3.5.1. Određivanje prinosa ekstrakcije.....	57
3.5.2. Određivanje fizioloških svojstva groždanih bobica.....	57
3.5.3. Spektrometrijsko određivanje ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....	57
3.5.4. Spektrometrijsko određivanje ukupnih antocijana.....	58
3.5.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	58
3.5.6. HPLC analiza fenolnih jedinjenja.....	58
3.5.7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	59
3.5.8. GC-MS analiza bio ulja iz semenki grozđa i komine.....	60
3.5.9. NMR analiza biodizela iz ulja semenki grozđa i komine.....	60
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	61
3.6.1. Analiza glavnih komponenti (PCA).....	61
3.6.2. Metodologije odziva površine (RSM).....	62
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	63
4.1. OTIMIZACIJA USLOVA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE (KE) FENOLNIH JEDINJENJA.....	64
4.1.1. Uticaj rastvarača i njihovog odnosa na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane, hidroksicimetne kiseline i flavonole iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac.....	64
4.1.2. Uticaj odnosa rastvarač-biljni materijal na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane flavonole i hidroksicimetne kiseline iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac.....	70
4.1.3. Uticaj temperature ekstrakcija na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane, flavonole, hidroksicimetne kiseline i flavanole iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac.....	73
4.1.4. Kinetika konvencionalne ekstrakcije fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac	76

4.1.5. Uticaj broja stepena ekstrakcije na prinos ekstraktivnih materija, ukupne fenole, antocijane flavonole i hidrosicimetne kiseline iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac	81
4.2. OTIMIZACIJA USLOVA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE (UE) FENOLNIH JEDINJENJA	84
4.2.1. Uticaj izbora frekvencije i ulazne snage ultrazvuka na ekstrakciju ukupnih fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac	84
4.2.2. Kinetika ultrazvučne ekstrakcije fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac.....	87
4.3. PRIMENA METODOLOGIJE ODZIVA POVRŠINE (RSM) ZA UTVRĐIVANJE OPTIMALNIH USLOVA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE FENOLNIH JEDINJENJA IZ SEMENKI BOBICA	90
4.4. UPOREDNA ANALIZA KONVENCIONALNE I ULTRAZVUČNE TEHNIKE ZA EKSTRAKCIJU FENOLNIH JEDINJENJA	98
4.5. ISPITIVANJE FIZIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA, FENOLNOG SADRŽAJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI GROŽĐA TOKOM ZRENJA.....	101
4.5.1. Promena fizioloških svojstva grožđa tokom zrenja	101
4.5.2. Promena sadržaja fenolnih jedinjenja tokom zrenja grožđa.....	103
4.5.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata grožđa tokom zrenja.....	106
4.5.4. HPLC analiza ekstrakata semenki i pokožice sorte Vranac pri punoj zrelosti grožđa	108
4.6. ANALIZA UTICAJA SPOLJNIH FAKTORA NA FIZIOLOŠKA SVOJSTVA I FENOLNI SADRŽAJ GROŽĐA VRANAC I MERLO TOKOM ČETIRI UZASTOPNE SEZONE	114
4.7. ISPITIVANJE UTICAJA SORTE GROŽĐA VITIS VINIFERA L. NA NJIHOVA FIZIOLOŠKA SVOJSTVA I FENOLNI SADRŽAJ PRIMENOM ANALIZE GLAVNIH KOMPONENATA	120
4.8. ANALIZA SPOREDNIH PROIZVODA PRERADE GROŽĐA SORTE VRANAC	123
4.8.1. Fenolni sadržaj ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa sorte Vranac	123
4.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa sorte Vranac.....	129
4.8.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa Vranac	130
4.8.4. Upporedna korelaciona analiza fenolnog sadržaja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa Vranac	131
4.9. ISPITIVANJE UTICAJA INFEKCIJE LISTA PLAMENJAČOM (Plasmopara Viticola) NA FENOLNI SASTAV, ANTIOKSIDATIVNU I ANTIMIKROBNU AKTIVNOST EKSTRAKATA LISTA VINOVE LOZE SORTI VRANAC I MERLO	137
4.9.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo.....	144
4.9.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo.....	144
4.9.4. Upporedna korelaciona analiza fenolnog sadržaja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo	147

4.10. PRIMENA SPOREDNIH DELOVA GROZDA	149
4.10.1. Primena semenke grožda i komine za dobijanje bio ulja	149
4.10.2. Primena bio ulja iz semenke grožda i komine za dobijanje biodizela	151
5. ZAKLJUČAK	158
6. LITERATURA	163
7. IZVOD	185
8. SUMMARY	188
9. BIOGRAFIJA	191
10. BIBLIOGRAFIJA	193
11. IZJAVE AUTORA	197

SKRAČENICE

ABTS 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ANOVA (eng. Analysis of variance) Jednosmerna analiza varijanse

ASE (eng. accelerated solvent extraction) Ubrzana ekstrakcija rastvaračima

ATTC (eng. American type culture collection) Kontrolni laboratorijski sojevi mikroorganizama

CAE (eng. Caffeic acid equivalents) ekvivalent kafeine kiseline

CBA test (Crocetin bleaching assay) Test obezbojavanja krocina

CCD (eng. Central composite design) Centralni kompozitni dizajn

DPPH• 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal

EC₅₀ (eng. efficient concentration) Efektivna koncentracija

F (eng. flavonol content) Flavonolni sadržaj

FLD (eng. fluorescence detector) Fluorescentni detektor

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) Antioksidativna snaga određena sposobnošću redukcije jona Fe³⁺ u Fe²⁺

FTIR (eng. Fourier transform infrared spectroscopy) Infracrvena spektrometrija sa Furijeovom transformacijom

GAE (eng. Gallic acid equivalents) Ekvivalent galne kiseline

GC-MS (eng. gas chromatography-mass spectrometry) Gasna hromatografija-masena spektrometrija

KE (eng. conventional solvent extraction) Konvencionalna ekstrakcija

MAE (eng. microwave-assisted extraction) Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

MEMK Metil-estari viših masnih kiselina

MBC (eng. Minimum bactericidal concentration) Minimalna baktericidna koncentracija

ME (eng. Malvidin-3-O-glucoside equivalents) Malvidin-3-O-glukozid

MIC (eng. Minimum inhibitory concentration) Minimalna inhibitorna koncentracija

NMR (eng. Nuclear magnetic resonance) Nuklearna magnetna rezonanca

ORAC (eng. Oxygen radical absorbance capacity) Kapacitet absorbance kiseoničnog radikala

PAD (eng. Photodiode array detector) Detektor sa nizom fotodioda

PCA (eng. Principal component analysis) Analiza glavnih komponenti

QE (eng. Quercetin equivalents) Kvercetin ekvivalent

RP-HPLC (eng. Reverse-phase high performance liquid chromatography) Tečna hromatografija visokih performansi sa reverznim fazama

RSA (eng. Radical scavenging activity) Kapacitet hvatanja slobodnih radikala

RSM (eng. Response Surface Methodology) Metodologija odziva površine

sbm suvabiljna materija

SFE (eng. Supercritical fluid extraction) Superkrična fluid ekstrakcija

SPME (eng. solid-phase microextraction) Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) Antioksidativni kapacitet određen preko ekvivalenata troleksa

TPC (eng. Total phenolic content) Ukupni fenolni sadržaj

UE (eng. ultrasound-assisted extraction) Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

UV-Vis (eng. ultraviolet-visible spectrophotometry) Ultravioletna-vidljiva spektrofotometrija

1. UVOD

Republika Srbija je jedan od glavnih proizvođača i prerađivača grožđa u zemljama zapadnog Balkana sa prosečnom godišnjom proizvodnjom grožđa od 330070 tona, od koga preradom nastaje oko 1700000 hektolitara vina i oko 66000 tona sporednih (nus) proizvoda (Zavod za statistiku R.Srbije, 2012). Poznatao je da se više od 20% neiskorišćenih delova vinove loze, kao što su listovi, semenke, ogrozdine odbacuje iz tehnološkog procesa tokom proizvodnje vina u vinarijama. Do sada u Srbiji nastali vinski otpad (komina) koristi se samo za proizvodnju rakije ili kao prirodno đubrivo. Zadnjih godina, intezivno se istražuju mogućnosti njegove primene, s jedne strane kao jeftin prirodni izvor različitih farmaceutskih proizvoda, a sa druge strane da bi se rešio problem zagađenja životne sredine.

Kao što je poznato grožđe sadrži fenolna jedinjenja, koja su veoma značajne bioaktivne komponente sa antioksidativnim, antikancerogenim, antiinflamatornim, antimikrobnim i antiviralnim svojstvima. Takođe, utvrđeni su pozitivni efekti ovih jedinjenja po zdravlje čoveka, naročito njihovo delovanje na kardiovaskularni sistem i bolesti srca, protiv starenja, arterioskleroze, hronične venske insuficijencije i drugih hroničnih bolesti. Procesom vinifikacije fenolnih jedinjenja (rastvorljivih u vodi) prelaze u vino, ali određena količina ostaje u komini. Mogućnosti ultrazvučne ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz sporednih proizvoda vinove loze, naročito od autohtone sorte grožđa Vranac do sada nisu naučno ispitivane.

U skladu sa zahtevima tehnološki i ekonomski razvijenog sveta, održivog razvoja i zelene hemije sporedni proizvodi vinove loze mogu predstavljati obnovljivi izvor energije. Imajući u vidu da semenke grožđa sadrže oko 20% ulja, mogu se primeniti za dobijanje biodizela. Smatra se da biodizel dobijen iz ove biomase ima dobre fiziko-hemijske karakteristike, kao što su: niskotemperaturna svojstva, cetanski broj/indeks (pokazatelj sklonosti goriva ka samopaljenju tj. procentualni udeo n-cetana u smeši sa α -metil naftalenom) i oksidativna stabilnost. Ova njihova potencijalna upotreba kao alternativnog goriva bi imala i ekološki i ekonomski pomak, naročito za karakteristične poljoprivredne regione jugoistočne Srbije.

Cilj ove doktorske disertacije je razvoj brze i efikasne ekstrakcione metode biološki aktivnih fenolnih jedinjenja iz sporednih proizvoda vinove loze autohtone sorte Vranac i internacionalne sorte Merlo, zbog mogućnosti njihove dalje primene u farmaceutskoj, kozmetičkoj i/ili prehrambenoj industriji, kao i razvoj efikasne ekstrakcione metode bioulja od koje bi našlo dalju energetska primenu kao biogorivo.

Rad je podeljen na: Opšti deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Izvod, Summary i Biografija sa Bibliografijom.

U Opštem delu opisane su ukratko osnovne karakteristike vinove loze i njenog hemijskog sastava, sa posebnim osvrtom na fenolni sastav. Takođe su predstavljeni literaturno poznati rezultati iz ove oblasti.

U Eksperimentalnom delu opisane su procedure ekstrakcije fenolnih jedinjenja i bio ulja iz uzoraka vinove loze, procedure analize fenolnih jedinjenja i bio ulja, procedure određivanja antioksidativne i antimikrobne aktivnosti dobijenih ekstrakata, procedure dobijanja biodizela iz ulja semenki i komine i njihova karakterizacija.

U delu Rezultati i diskusija prikazani su rezultati izvršenih analiza i izvedene određene korelacije pomoću odgovarajućih statističkih softverskih paketa.

U Zaključku su dati zaključci izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i dobijenih korelacija.

U Izvodu dat je karatak pregled korišćenih metoda i dobijenih rezultata.

2. OPŠTI DEO

2.1. VINOVA LOZA

2.1.1. Osnovne botaničke karakteristike vinove loze (*Vitis vinifera* L.)

Vinova loza (rod *Vitis* L.) pripada porodici *Vitaceae* (lijane). Rod obuhvata oko 70 vrsta širom sveta od kojih se samo neke uzgajaju (Jing i sar., 1999).

Vitis L. je podeljen u dva podreda: *Euvitis* Planch. i *Muscadinia* Planch. Na osnovu geografske rasprostranjenosti *Euvitis* Planch dele se u tri grupe, gde pripada i *Vitis vinifera*., *Muscadinia* Planch., poreklom iz jugoistočnih SAD-a, genetski se razlikuje od *Euvitis* vrste (Kong, 2004).

Vitis vinifera je danas najrasprostranjenija vrsta roda *Vitis* L. Poreklo vodi iz oblasti Kaspijskog mora i Male Azije, gde se još uvek mogu pronaći samonikli primerci koji pripadaju ovom rodu (Johanson, 1989; Bombardelli i sar., 1995).

To je višegodišnja loza odrvenelog stabla (slika 2.1).



Slika 2.1: Vinova loza

Njeni zeljasti izdanci (lastari) mogu dostići dužinu i do 35 m, ali se pri gajenju obično orezuju na dužinu od 1 do 3 m. Listovi vinove loze naizmenično su raspoređeni, režnjeviti, nazubljeni po obodu, goli na licu i, često, dlakavi na naličju. Cvetovi vinove loze su brojni, mirisni i za razliku od listova, grupisani u složene cvasti tipa grozda (slika 2.2). Plodovi su sočne bobice, prečnika 6 do 22 mm, udruženi u duge i velike grozdove. Bobice su različitog oblika i

boje: često su okruglaste do ovalne, zelene ili žute, crvene ili crnoljubičaste pokožice. U sočnoj pulpi ploda, obično se nalaze 2 do 4 jajolika semena, mada često izostaju (List i sar., 1979; Ratsch, 1998).



Slika 2.2: Vinova loza: 1 – cvetovi grupisani u obliku grozda, 2 – cvet u različitim fazama, 3 – lastar, 4 – peteljka, 5 – list, 6 – zrele bobice (plod) grupisane u obliku grozda

Vrsta *Vitis vinifera* se, u taksonomskoj klasifikaciji deli u dve glavne podvrste. Jedna je ssp. *sylvestris* (Gmelin) Berger, koja se smatra samoniklom, a druga ssp. *vinifera*, koja se uglavnom gaji (Bombardelli i sar., 1995; Ratsch, 1998).

Vinova loza je čoveku odavno poznata, o čemu svedoče arheološki nalazi fosilizovanih listova i semena iz perioda miocena i tercijera, poreklom iz kontinentalne Evrope, Engleske, Islanda i Severne Amerike. Semena bobica grožđa koja su pronađena u nalazištima iz Bronzanog doba ili u grobnicama starog Egipta morfološki su vrlo slična onima koje danas poznajemo (McGovern, 1995).

Smatra se da je prvi uspešan pokušaj kultivisanja vinove loze zabeležen u regionu Kaspijskog mora, odakle se vinova loza, sada kao kulturna biljka raširila. Prema zapadu, doprla je najpre do obala Grčke (u periodu između 18. i 16. veka p.n.e.), Italije (9. do 7. veka p.n.e.) i današnja Francuske, približno 6. veka p.n.e. (McGovern, 1995). Na istoku, vinova loza je najpre kultivisana na teritoriji današnje Turske, da bi se postepeno proširila preko teritorija Persije (današnji Iran) do Indije i Kine pred kraj 2. veka p.n.e. (Johanson, 1989).

Danas se vinova loza gaji najviše u toplim krajevima, prvenstveno u Sredozemnom basenu južne Evrope (Grčka, Italija, Francuska, Španija) i centralne Azije (Bombardelli i sar., 1995). Međutim, sve veći značaj imaju i vinogorja Južnoafričke Republike, SAD (Kalifornija), Argentine, Čilea, Australije i Novog Zelanda. To su regioni sa klimatskim i pedološkim karakteristikama koje izuzetno pogoduju vinovoj lozi: preovlađuju duga, topla, suva leta i blage zime, dok je zemljište ovih krajeva peskovito, ocedito i rastresito (Bombardelli i sar., 1995).

2.1.2. Hemijski sastav vinove loze

Grožđe se klasifikuje kao stono grožđe, vinsko grožđe, suvo grožđe, i to sa jestivim semenkama ili bez semenki. Grožđe ima nutritivnu vrednost jer sadrži vitamine, minerale, ugljene hidrate i druge fitoelemente.

Od početka 20. veka do danas, izvedena su brojna istraživanja hemijskog sastava različitih organa vinove loze, koja su pokazala da je hemijski sastav različitih varijeteta i genotipa izuzetno promenljiv (Marais i sar., 1991; Kennedy i sar., 2000; Zhu i sar., 2012).

Do sada je iz plodova i listova vinove loze izolovan veliki broj različitih jedinjenja, koja se mogu svrstati prema hemijskoj strukturi u nekoliko velikih grupa. To su: fenolna jedinjenja, organske kiseline, vitamini, enzimi, ugljeni hidrati, organska jedinjenja sa azotom, terpenoidi i isparljiva jedinjenja, voskovi, lipidi, polisaharidi i gume (slika 2.3).



Slika 2.3: Hemijski sastav bobica grožđa

2.1.2.1. Ugljeni hidrati

Ukupni sadržaj ugljenih hidrata u plodu vinove loze značajno varira, ne samo pod uticajem genetskih faktora (pripadnosti određenom varijetetu), već i pod uticajem faktora životne sredine. Obično se kreće u širokom rasponu između 9 i 20 %. Glukoza i fruktoza predstavljaju osnovne šećere ploda vinove loze. Njihova količina i međusobni odnos variraju tokom sazrevanja ploda. U nezrelim bobicama dominira glukoza, da bi se pri kraju procesa sazrevanja ovaj odnos promenio u korist fruktoze (Possner i Kliewer, 1985; Kennedy i sar., 2000). Plodovi ove biljne vrste sadrže i polisaharide, uglavnom hemicelulozu.

2.1.2.2. Organske kiseline

Plodovi i listovi vinove loze bogati su organskim alifatičnim kiselinama. Najveći udeo u ukupnom sadržaju pripada vinskoj i jabučnoj kiselini, na koje odlazi više od 90 % (Riberéau-Gayon i sar., 1989; Hidalgo-Togores, 2002). Limunska i sirćetna kiselina takođe su prisutne, mada u znatno nižim koncentracijama. Kiseli kalijum-tartarat, kao so vinske kiseline, prisutan je ispod pokožice zrelih plodova i javlja se u vidu kristalnog taloga, a nezreli plodovi sadrže oksalnu kiselinu.

2.1.2.3. Organska jedinjenja sa azotom

Ovoj klasi sastojaka vinove loze pripadaju prvenstveno slobodne aminokiseline i rastvorljivi proteini. Od slobodnih aminokiselina u plodovima vinove loze identifikovane su: alanin, γ -aminobuterna kiselina, arginin, glutaminska kiselina, prolin, serin i treonin (Stines i sar., 2000). Rastvorljivi proteini vinove loze se, hidrolizom, razlažu na glicin, alanin, leucin, izoleucin, fenilalanin, tirozin, treonin i druge aminokiseline.

2.1.2.4. Lipidi

Semenke iz grožđa (ploda) vinove loze sadrže ulje, čija količina varira između 6 i 20 % u zavisnosti od kvaliteta sirovine i tehnološkog postupka dobijanja ulja (Ohnishi i sar., 1990;

Baydar i sar., 2007; Martinello i sar., 2007). Glavni sastojci ovih lipida su slobodne masne kiseline: palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linoleinska. Glavna karakteristika ulja od semenki grožđa jeste visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina, kao što je linoleinska, 72-76% (Martinello i sar., 2007). Pored njih, ulje semenki grožđa sadrži sterole (Elshami i sar., 1992), tokoferole (Baydar i sar., 2007), kao i fosfolipide (Ohnishi i sar., 1990). Ovo ulje je jestivo, a nalazi primenu i u kozmetičkoj industriji.

2.1.2.5. *Isparljivi sastojci grožđa koji utiču na aromu*

Isparljivi sastojci grožđa su, pored polifenolnih jedinjenja, najčešće istraživana klasa prirodnih proizvoda koji se mogu identifikovati u njemu. Uglavnom su odgovorni za miris ploda (od kojeg zavisi aroma vina), što je jedan od osnovnih razloga zbog kojih se ovoj klasi poklanja tolika pažnja. Sastojci koji su odgovorni za aromu grožđa su uglavnom terpenoidi (Koslitz i sar., 2008). Najznačajniji su *o*-cimen, limonen, (*Z*)- β -ocimen, (*Z*)-linalooloksid, linalool, izoborneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, (*E*)-sabinilacetat, i (*E*)-kalamenen (Veverka i sar., 2012).

Pored terpenoida na aromu vina utiču i sledeća jedinjenja iz grožđa norizoprenoidi, fenilpropanoidi, metoksipirazini, i isparljiva sumporna jedinjenja (Ebeler i Thorngate, 2009; Gonzalez-Barreiro i sar., 2013).

2.1.2.6. *Karotenoidi*

Karotenoidi se akumuliraju u pokožici grožđa pre *veraison* (Marais i sar., 1991; Razungles i sar., 1988; Guedes de Pinho i sar., 2001). β -karoten i lutein čine 85% od ukupnih karotenoida, a ostali su neohrom, neoksantin, violaksantin, luteoksantin, flavoksantin, lutein-5,6-epoksid zeaksantin (Mendes-Pinto 2009).

2.1.2.7. *Minerali*

U vinovoj lozi mogu se naći kalijum, natrijum i kalcijum u obliku karbonata ili oksida, a takođe u maloj količini ima i gvožđa i bakra koji imaju katalitičku ulogu (Riberéau-Gayon i sar.,

1989; Hidalgo-Togores, 2002). Najzastupljeniji anjoni u vinovoj lozi su fosfati, sulfati i hloridi, u tragovima brom, jod i fluor (Riberéau-Gayon i sar., 1989; Hidalgo-Togores, 2002).

2.1.2.8. Vitamini

Plodovi vinove loze smatraju se relativno skromnim izvorom vitamina. Oni sadrže određene količine vitamina C, A i B-kompleksa (Matthews, 1959).

2.1.2.9. Enzimi

U nezrelim bobicama grožđa, najznačajniji i najaktivniji enzimi su razne invertaze, koje imaju ključnu ulogu u akumulaciji šećera tokom sazrevanja. Pored invertaza, značajnu ulogu u biohemijskim aktivnostima unutar ploda imaju i dehidrogenaze, katalaze, oksidaze, peroksidaze i esterase (Cheynier i sar., 2000).

2.1.2.10. Voskovi

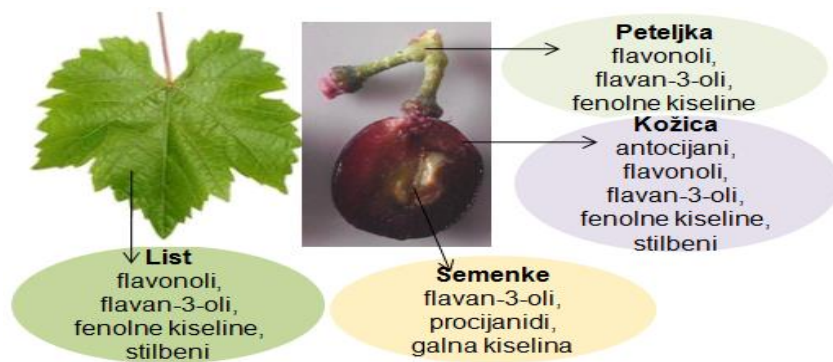
Voskovi se obično nalaze na površini ploda, u vidu pepeljaste prevlake, čija je debljina varijabilna i zavisi od varijeteta. Osnovni sastojak voskova je oleanolna kiselina, kojoj pripada 50-70 %; ostatak čine različiti viši alkoholi, slobodne masne kiseline, aldehidi ili ugljovodoni.

2.1.2.11. Ostali sastojci

Groždani sok sadrži značajnu količinu rastvorljivog pektina, dok je nerastvorljivi oblik ovog sastojka uglavnom vezan za unutrašnju površinu ćelijskih zidova (Cerde i sar., 1994). Ove supstance odgovorne su za omekšavanje bobica tokom zrenja ploda.

2.2. FENOLNA JEDINJENJA VINOVE LOZE

Vinova loza je jedna od retkih biljaka koja je veoma bogata različitim fenolnim jedinjenjima. Tu su prostija fenolna jedinjenja kakve su fenolne kiseline (derivati hidroksi-benzoeve i hidroksicimetne kiseline), ali i složenija flavonoidi (antocijani, flavonoli, flavan-3-oli, procijanidini i dr.). Ova jedinjenja rasprostranjena su u svim organima vinove loze (slika 2.4). List vinove loze bogat je flavanolima, flavan-3-olima, fenolnim kiselinama i stilbenima (Pezet i sar., 2003; Monagas i sar., 2006; Dani i sar., 2010). Peteljka je bogata flavanolima, flavan-3-olima i fenolnim kiselinama (Makris i sar., 2008). Plod je bogat različitim klasama fenolnih jedinjenja koje su različito raspoređene u pokožici, semenki i pulpi bobice (slika 2.4). Semenke su bogate monomerima i oligomerima flavan-3-ola i derivatima galne kiseline (Kennedy, 2008). Sastav pokožice se razlikuje kod belih i crvenih sorti vinove loze. Crvene sorte u pokožici sadrže antocijane, flavonole, flavan-3-ole, fenolne kiseline i stilbene, dok kod belih nema antocijana a ostalih klasa fenolnih jedinjenja ima u većoj količini (Xia i sar., 2010; Zhu i sar., 2012). U pulpi ima neznatna količina ovih jedinjenja pretežno fenolne kiseline (Pastrana-Bonilla i sar., 2003).

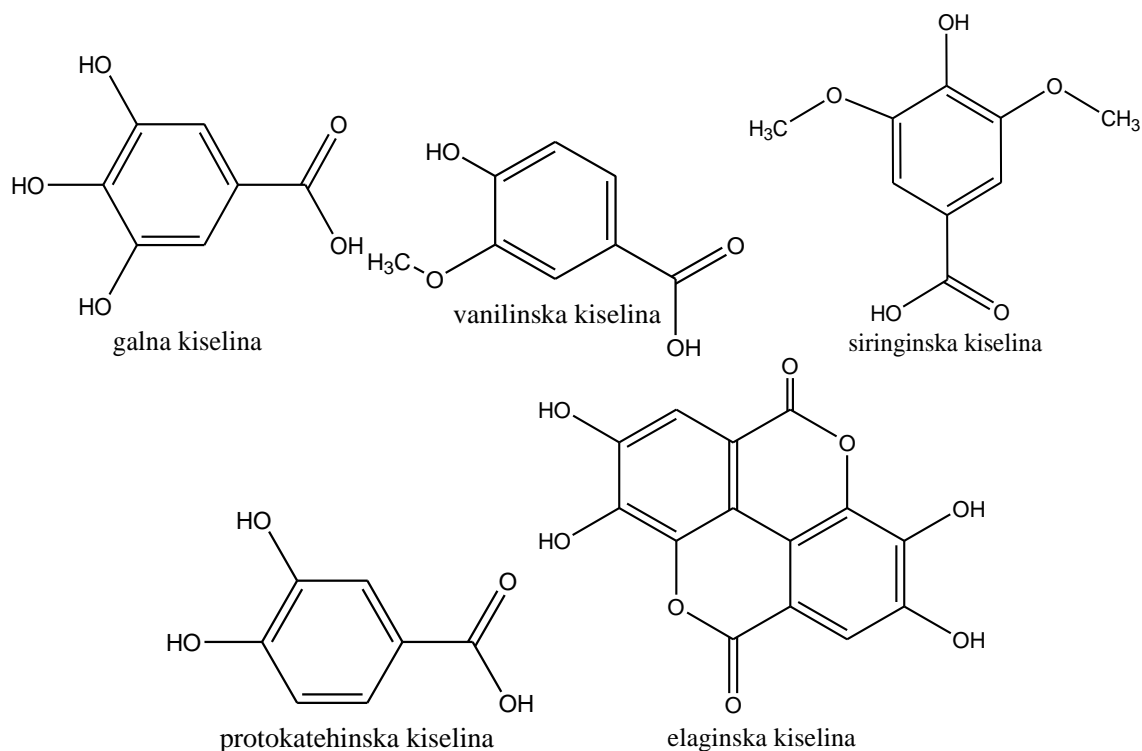


Slika 2.4: Fenolni sastav lista, peteljke, pokožice i semenke vinove loze

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su zastupljene u svim organima vinove loze u različitim količinama. Javljaju se kao hidroksi derivati benzoeve i cimetne kiseline.

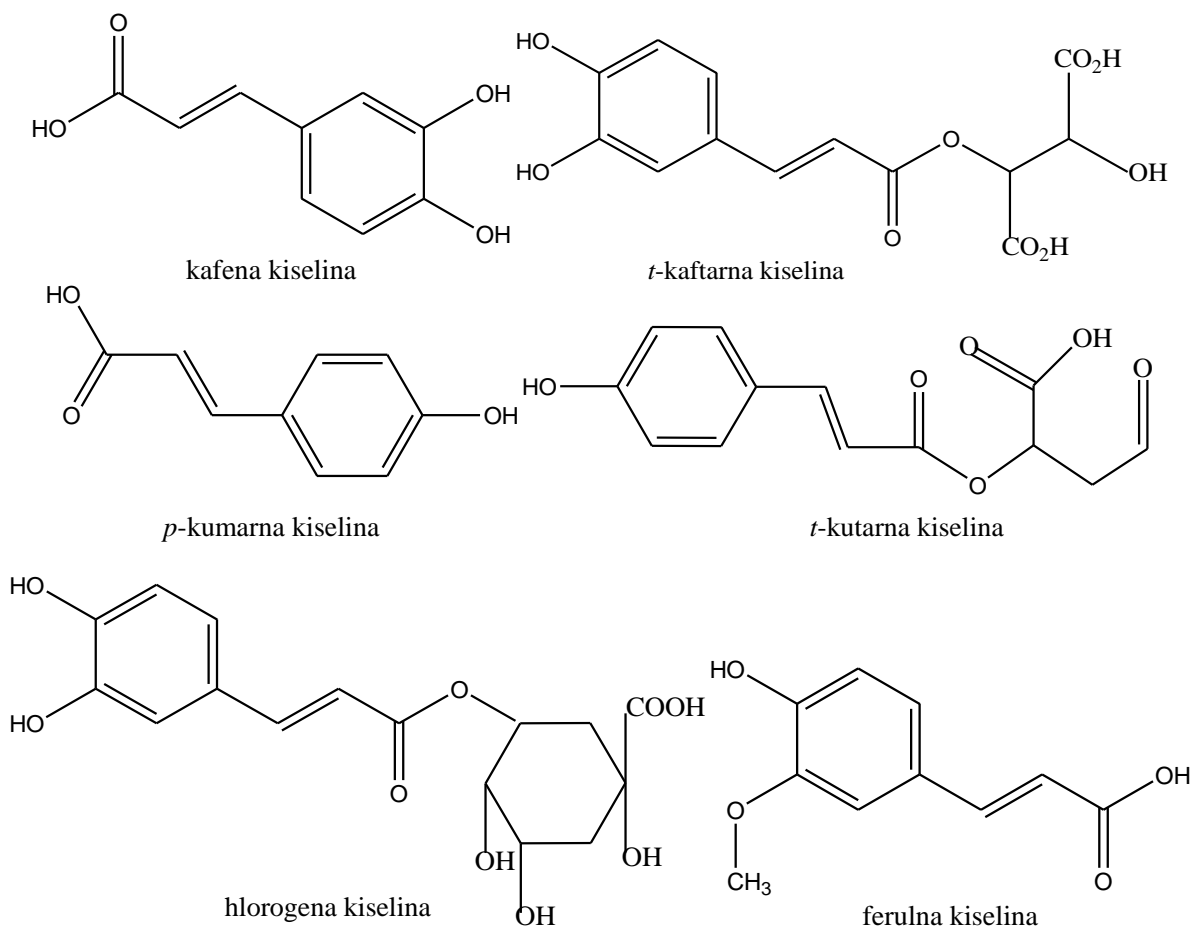
Od derivata hidroksibenzoeve kiseline najzastupljenija je galna kiselina, a prisutne su i *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina (Kennedy, 2008; Lachman i sar., 2009; Zhu i sar., 2012). Najzastupljenije hidroksibenzoeve kiseline su prikazane na slici 2.5.



Slika 2.5: Derivati hidroksibenzoeve kiseline iz različitih organa vinove loze

Hidroksicimetine kiseline takođe su zastupljene u svim organima vinove loze u različitoj koncentraciji i sastavu u zavisnosti od sorte vinove loze (Kennedy, 2008; Zhu i sar., 2012). Najzastupljenije su: *p*-kumarna, kafena, *t*-kutarna, *t*-kaftarna, ferulna, sinapinska i hlorogena kiselina (Lachman i sar., 2009; Anastasiadi i sar., 2010; Zhu i sar., 2012).

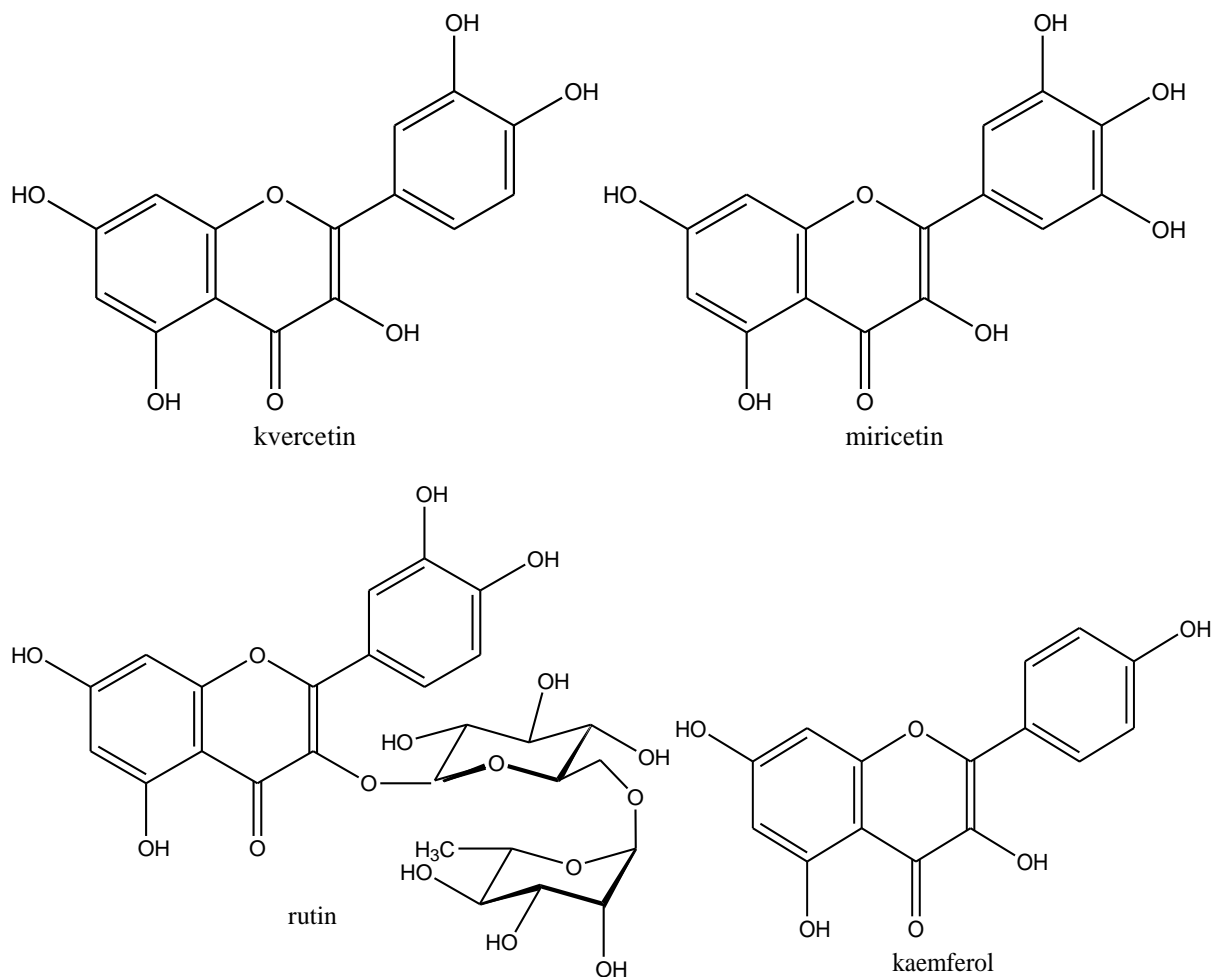
Manji deo fenolnih kiselina nalazi se u slobodnom obliku dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljke (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulima kao što su glukoza, maleinska i vinska kiselina (Zhu i sar., 2012). Najzastupljeniji derivati ovih kiselina prikazani su na slici 2.6.



Slika 2.6: Derivati hidroksi-cimetne kiseline iz različitih organa vinove loze

2.2.2. Flavonoli

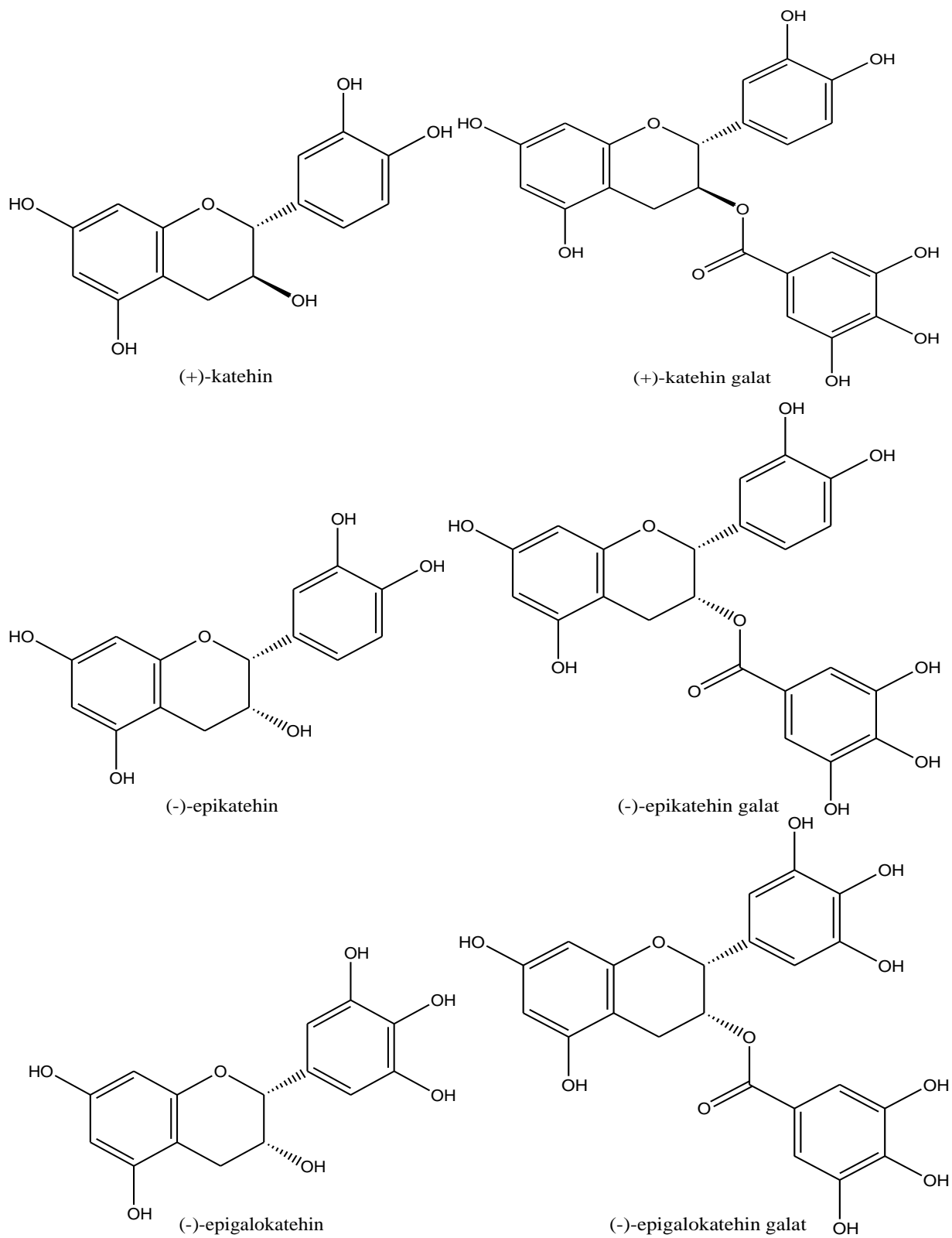
Flavonoli su veoma značajna klasa fenolnih jedinjenja koja su pronađena u vinovoj lozi u listovima, peteljka i pokožici, a nisu prisutni u semenkama i pulpi (Pastrana-Bonilla i sar., 2003; Monagas i sar., 2006; Makris i sar., 2008; Dani i sar., 2010; Zhu i sar., 2012). Najzastupljeniji flavonoli u vinovoj lozi su kvercetin, rutin, morin, miricetin i kemferol (slika 2.7), a pored slobodnog oblika najčešće se sreću u formi glukozida, galaktozida i rutinozida (Pastrana-Bonilla i sar., 2003; Monagas i sar., 2006; Makris i sar., 2008; Dani i sar., 2010; Zhu i sar., 2012).



Slika 2.7: Flvonoli iz različitih organa vinove loze

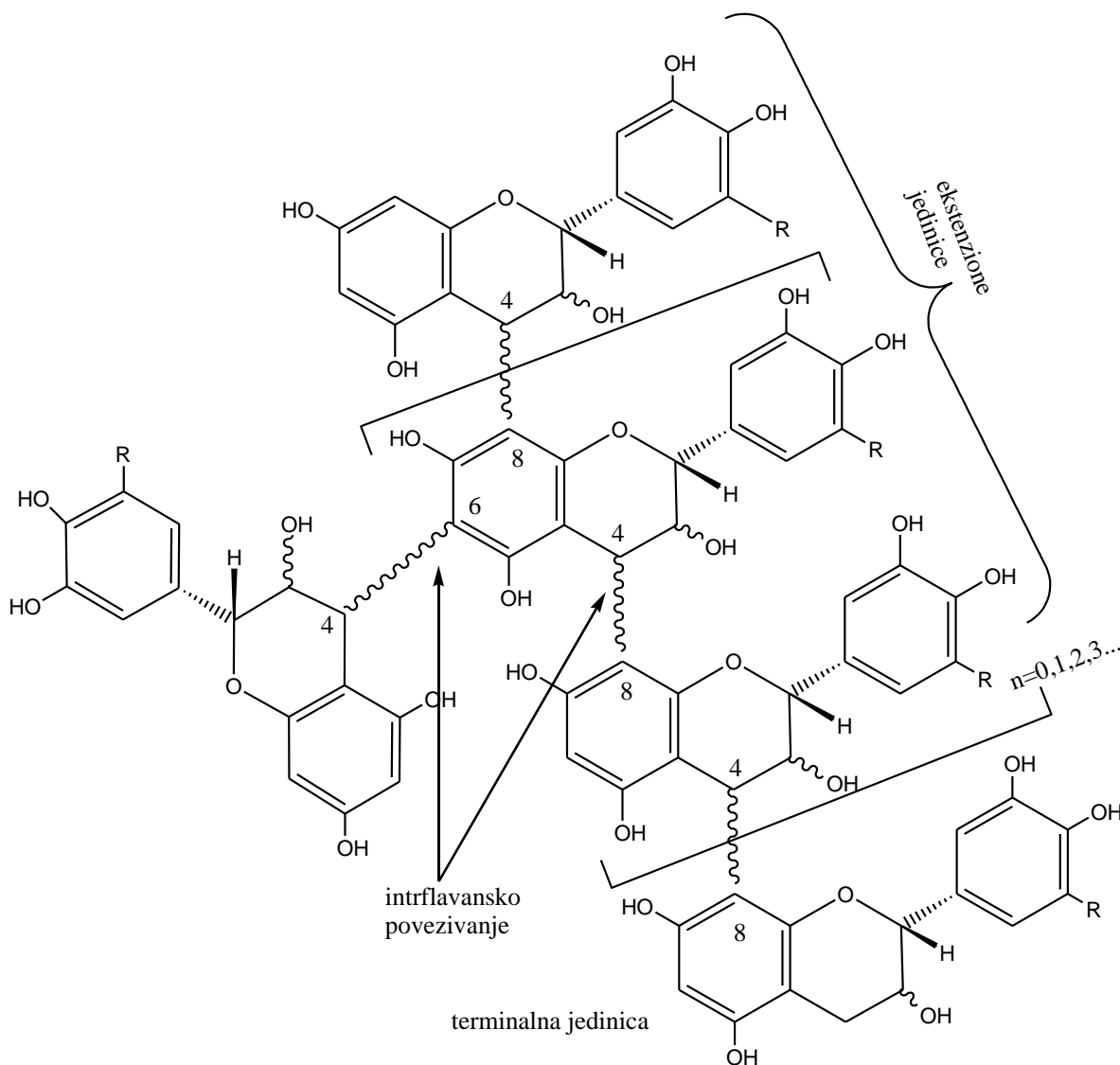
2.2.3. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su najzastupljenija klasa fenolnih jedinjenja pronađenih u semenkama grožđa, ali se su takođe prisutna i u pokožici, peteljka i listovima vinove loze (Anastasiadi i sar., 2010; peteljke, listovi, Zhu i sar., 2012). Iz ekstrakta različitih organa vinove loze izolovani su: (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin i (-)-epigalokatehingalat (Kennedy, 2008; Anastasiadi i sar., 2010; Zhu i sar., 2012). Ova jedinjenja prikazana su na slici 2.8.



Slika 2.8: Flavan-3-oli iz različitih organa vinove loze

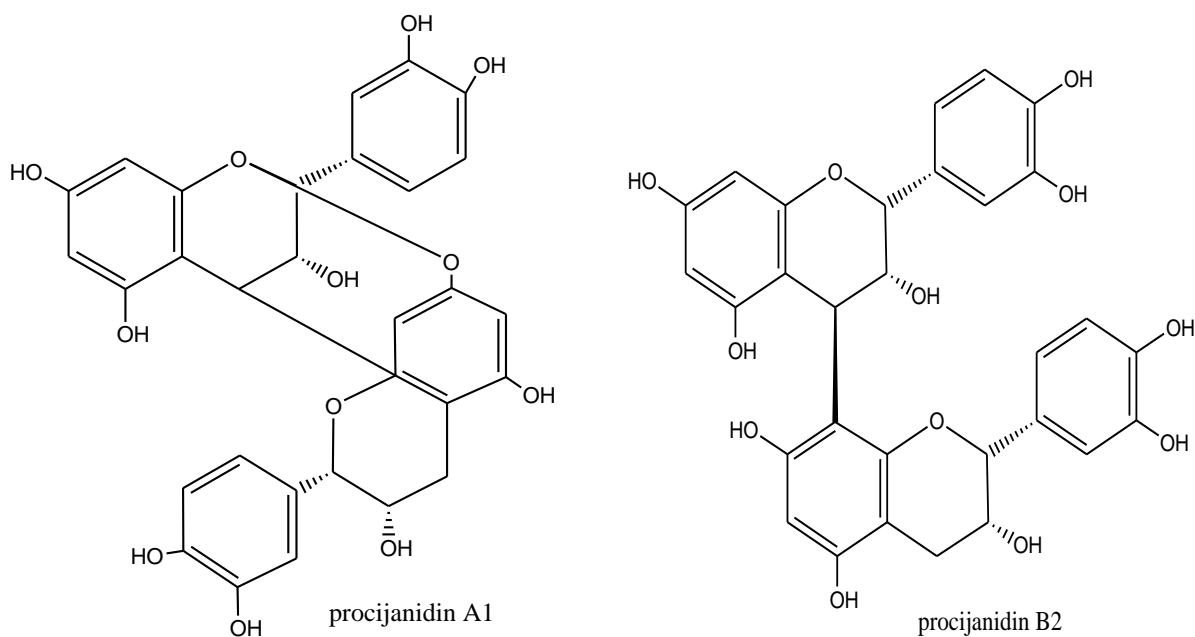
U vinovoj lozi takođe su pronađeni u značajnoj količini oligomerni i polimerni derivati flavan-3-ola poznati kao kondenzovani tanini ili proantocijanidini (Kennedy, 2008; Anastasiadi i sar., 2010; Lachman i sar., 2009). Oni se sastoje od više međusobno povezanih monomernih jedinica interflavanskim vezama, najčešće od (+)-katehina i (-)-epikatehina (slika 2.9.):

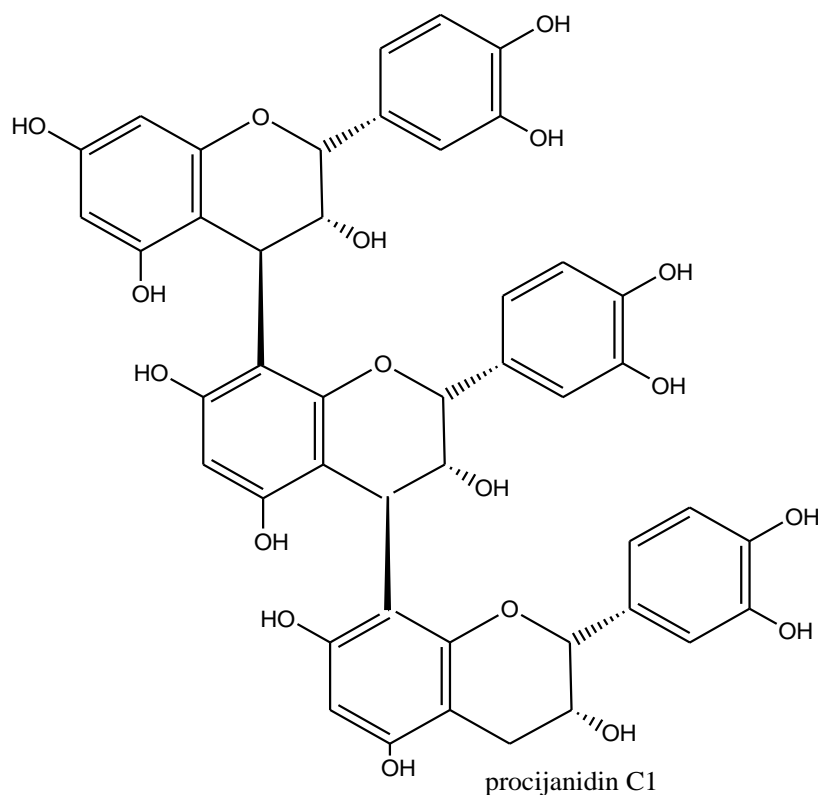


Slika 2.9: Polimer flavan-3-ola koji se sastoji od više monomernih jedinica flavan-3-ola ($n=0,1,2,3\dots$) povezanih interflavanskim vezama (C4-C8 i/ili C4-C6)

Proantocijanidini su sastavljeni od terminalnih i ekstenzionih flavan-3-olnih monomernih jedinica, međusobno povezanih interflavanskim vezama C-4 i C-8, kao i manje zastupljenim C-4 i C-6 (Haslam, 1998). U pokožici grožđa, katehin je primarna terminalna jedinica povezan sa epikatehinom i epikatehingalatom u mnogo manjoj meri (Souquet i sar., 1996; Kennedy i sar. 2001; Downey i sar., 2003). Epikatehin je najčešća ekstenziona jedinica, praćena epigalokatehinom i epikatehingalatom (Souquet i sar., 1996; Kennedy i Jones, 2001; Downey i sar., 2003; Monagas i sar., 2003).

Najznačajniji predstavnici proantocijanidina prikazani su na slici 2.10.





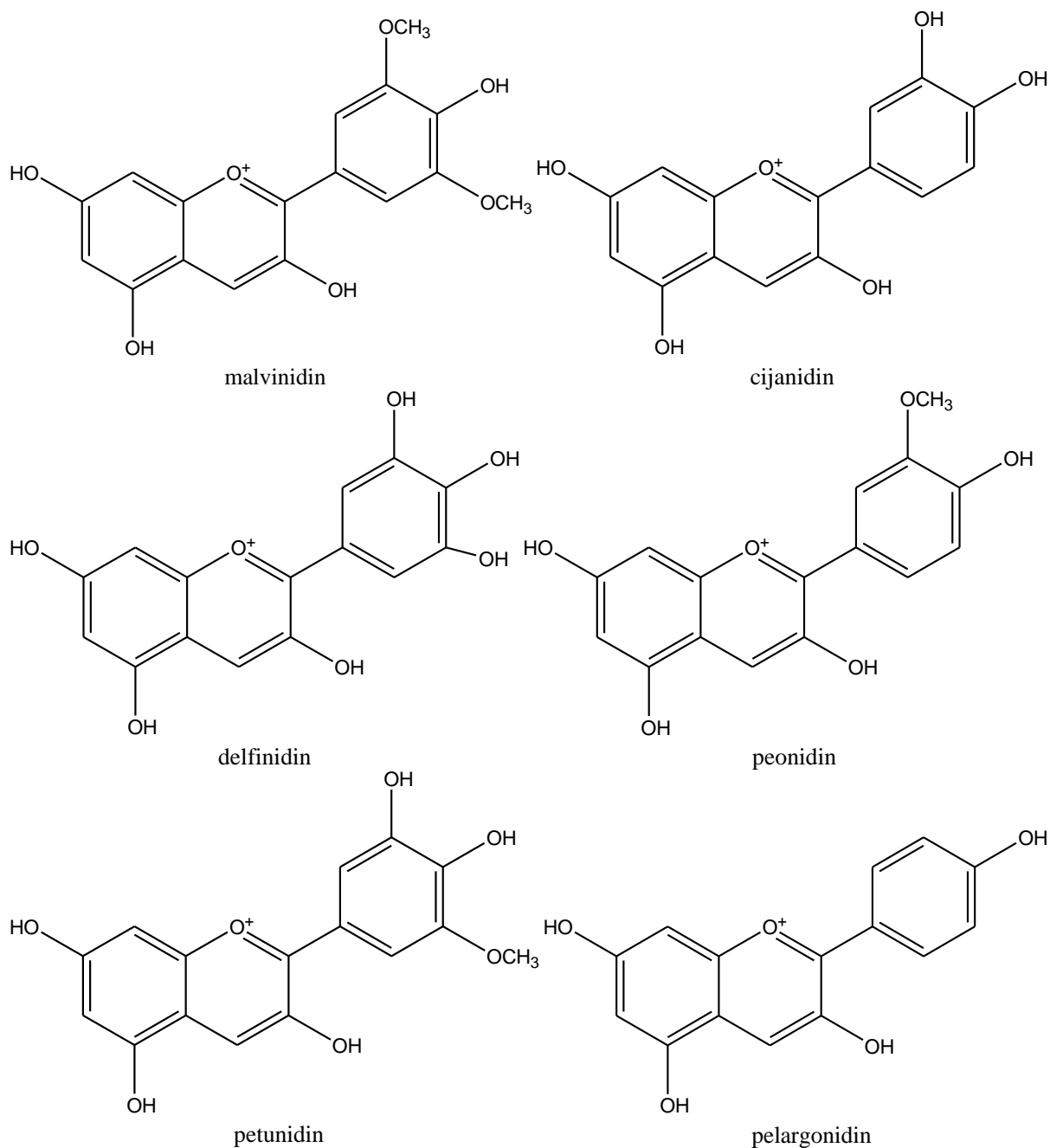
Slika 2.10: Tipovi oligomera flavan-3-ola koji se sreću u različitim organima vinove loze.

Dimeri: A-tip (procijanidin A1) i B-tip (procijanidin B2) i trimer: C-tip (procijanidin C1)

2.2.4. Antocijani

Antocijani su važna grupa prirodnih boja, koji pripadaju flavonoidima. To su jedinjenja sa dva aromatična prstena, povezana strukturom od tri ugljenikova atoma i supstituisani sa jednim ili dva šećerna ostatka. Antocijani predstavljaju uglavnom vodorastvorne pigmente, koji su direktno odgovorni za boju grožđa i vina crvenih sorti vinove loze (Goiffon i sar., 1999; Fossen i sar., 2002). U pokožicama grožđa crvenih sorta vinove loze izolovani su: 3-glukozidi delfinidina, cijanidina, peonidina, malvidina (Baldi i sar., 1995; Heredia i sar., 1998; Revilla i sar., 1998; Goiffon i sar., 1999; Fossen i sar., 2002; Saenz-Lopez i sar., 2003; Núñez i sar., 2004); 3-acetilglukozidi malvidina, delfinidina, petunidina, peonidina, cijanidina; 3-kumaril-glukozidi malvidina, delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina (Goiffon i sar., 1999; Fossen i sar., 2002; Saenz-Lopez i sar., 2003; Núñez i sar., 2004); 3,5-diglukozidi delfinidina, petunidina (Fossen i sar., 2002) i 3-kafeoil-glukozidi peonidina, malvidina (Fossen i sar., 2002; Saenz-

Lopez i sar., 2003). Najčešći antocijanidini (aglikoni) su cijanidin, delphinidin, malvinidin, pelargonidin, peonidin i petunidin (slika 2.11), a kada su supstituisani šećernom frakcijom (sa ili bez acilne supstitucije) onda su antocijani (slika 2.12).



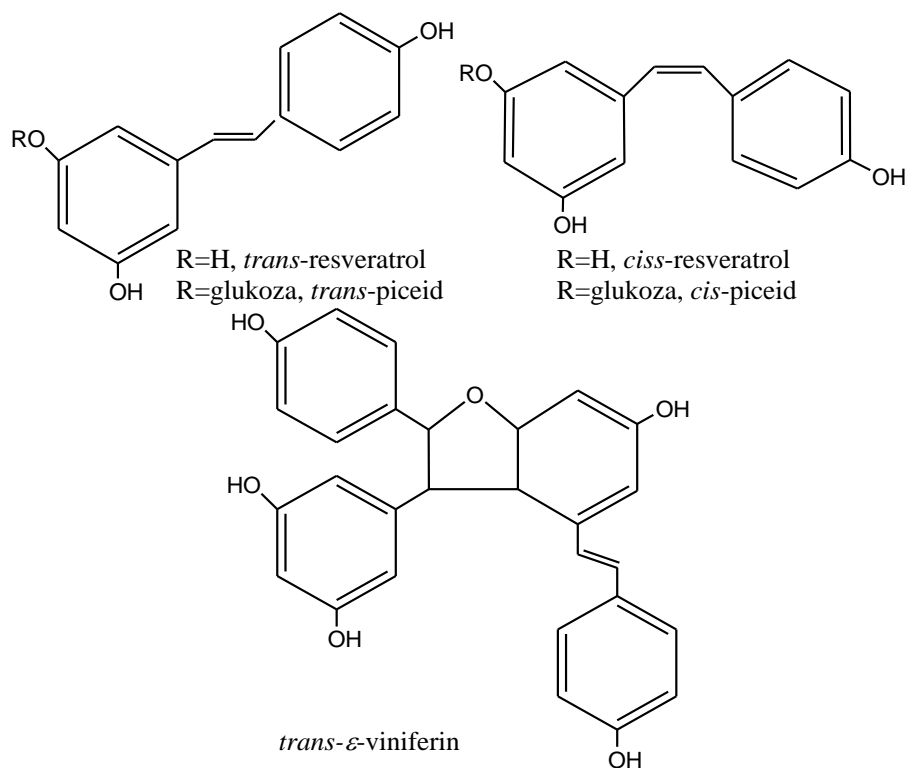
Slika 2.11: Antocijanidini iz pokožice bobica crvenih sorti vinove loze

2.2.5. Stilbeni

Stilbeni su jedinjenja koja se pri uobičajenim okolnostima ne mogu naći u organima vinove loze, ili su prisutna u vrlo maloj količini (Pezet i sar., 2003; Sun i sar., 2006; Lachman i sar., 2009; Anastasiadi i sar., 2010; Zhu i sar., 2012).

Ovi sastojci se, pod uticajem različitih faktora životne sredine, ubrzano sintetišu i akumuliraju u njenim tkivima, a poznati su pod zbirnim nazivom “fitoaleksini”. Ovo su jedinjenja sa jakim antimikrobnim delovanjem, koje biljka sintetiše kao odgovor na bakterijske i gljivične infekcije i smatraju se glavnim nosiocima mehanizma otpornosti na različite biljne bolesti.

Među ovim jedinjenjima, značajno mesto zauzimaju derivati stilbena: resveratrol, piceid i viniferini (oligomeri resveratrola). *Cis* i *trans* izomeri ovih jedinjenja prikazani su na slici 2.13.



Slika 2.13: Najčešće prisutni stilbeni u pojedinim organima vinove loze

2.3. PROMENE HEMIJSKOG SASTAVA GROŽĐANIH BOBICA TOKOM ZRENJA GROŽĐA

Hemijski sastav grožđa veoma je bitan za kvalitet gotovih proizvoda kao što su vino i sok. Zbog toga je važno odrediti kada se pojedina nutritivna i biološki značajna jedinjenja akumuliraju u bobici kako bi se primenom odgovarajućih agrotehničkih mera u fenofazi sazrevanja grožđa uticalo na pojačanje ili slabljenje njihove sinteze.



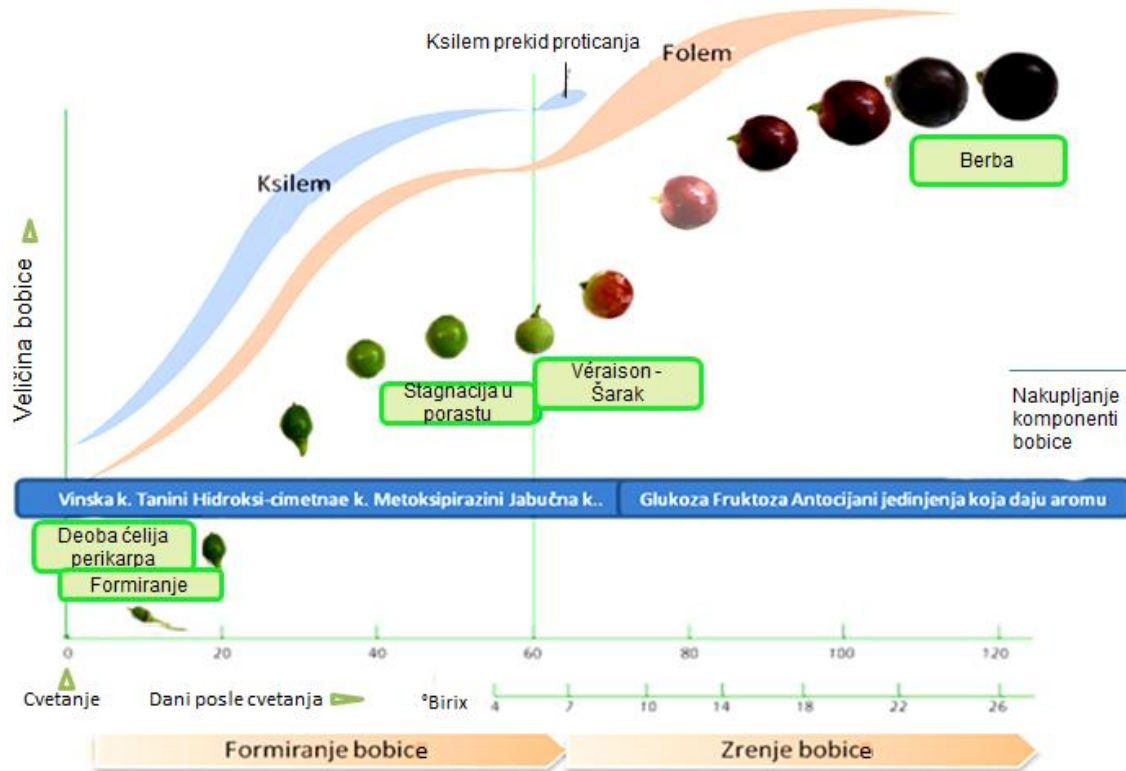
Slika 2.14: Faze razvoja ploda vinove loze – grožđanih bobica

Grozd se snabdeva preko peteljke razgranatim sprovodnim sistemom: ksilemom i floemom. Ksilem je odgovoran za transport vode, minerala, regulatora rasta i hranljivih sastojaka od korenovog sistema do ostalih organa vinove loze. Dosadašnja saznanja pokazuju da je ksilem

funkcionalan u bobicama u ranoj fazi njihovog razvoja pa sve do šarka- *véraison* (period kada su bobice dostigle punu veličinu i zelene su boje), ali nakon toga, njegova funkcija se smanjuje ili isčezava (Greenspan i sar., 1994). Floem je odgovoran za transport hranljivih materija koja se stvaraju fotosintezom (kao na primer ugljenohidrati). Aktivan je iz same činjenice da se u zelenoj bobici stvara svega 1/3 nove organske materije, odnosno 2/3 organske materije se stvara u listovima i transportuje do bobica.

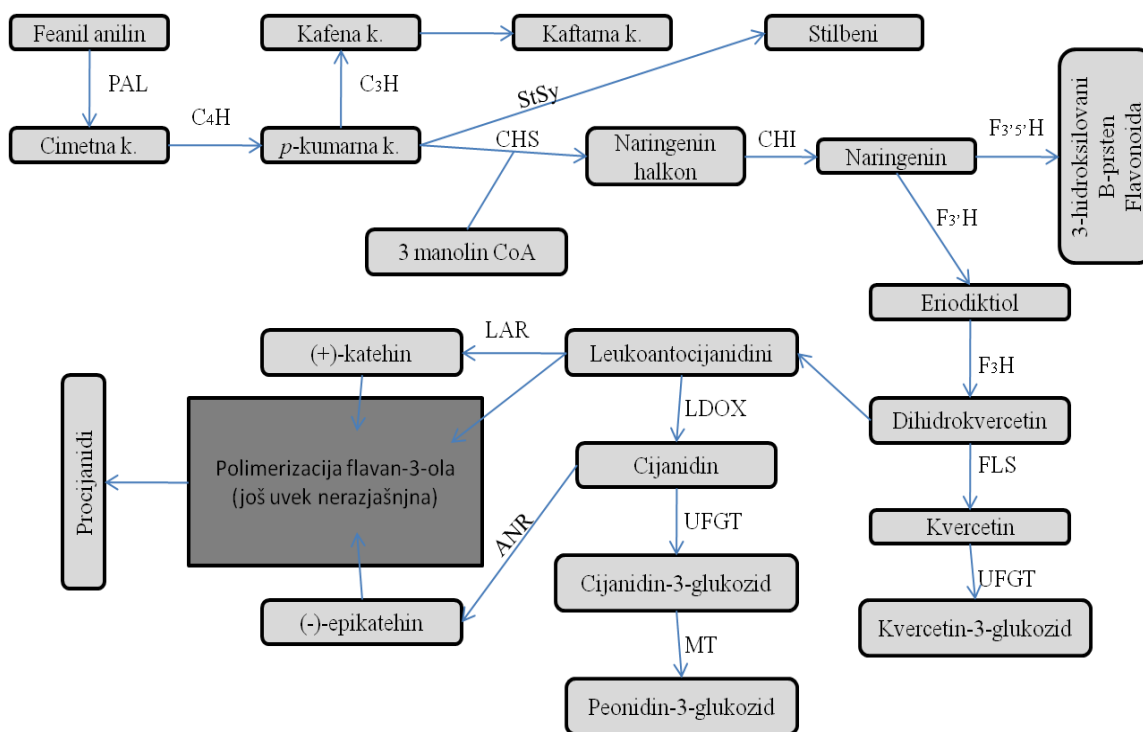
U toku vegetacije razlikujemo nekoliko fenofaza razvoja, samo ime vezano je za najintenzivniji proces koji se odvija u naznačeno vreme. Početak vegetacije označen je otvaranjem okaca i porastom lastara, i traje do cvetanja. Zametanjem, bobica intenzivno raste na račun deobe ćelija plodnika, da bi se pred kraj intenzivirao proces povećanja zapremine postojećih ćelija. Vidljiva promena u pojedinačnim bobicama je u prošaranoj pokožici, zato nosi ime “šarak” - *véraison*. Sa ovom vidljivom promenom intenzivira se proces sazrevanja i završava sa punom zrelošću grožđa (slika 2.14). Međutim, razvoj bobica u smislu najintenzivnijih promena u hemijskom sastavu obuhvata tri faze prikazane na slici 2.15.

Prvi period rasta bobice od cvetanja do šarka traje približno 60 dana. Za vreme ovog perioda formiraju se bobice i semenke. Bobice se povećavaju u zapremini zbog akumuliranja hranljivih materija (Possner i Kliwer, 1985). Dominiraju vinska i jabučna kiselina. Vinska kiselina je raspoređena u perifernom delu bobice a jabučna u pulpi. Hidroksicimetne kiseline se takođe akumuliraju u ovom periodu u pulpi i pokožici (Romeyer i sar., 1983). Flavan-3-oli se takođe akumuliraju u prvom periodu rasta i najviše su prisutni u pokožici i semenkama (Kennedy i sar., 2000b; Kennedy i sar., 2001).



Slika 2.15: Porast bobice i promene u boji tokom 10-dnevnih intervala od cvetanja, zmetanja sa izdvojenim procesima: formiranje, stagnacija u porastu, šarak do potpune zrelosti sa naznačenim intenzitetom promena u sintezi i akumulaciji najvažnijih jedinjenja (prerađena ilustrcija Coombe i McCarthy, 2001)

Biosinteza fenolnih jedinjenja u grožđu bila je predmet proučavanja mnogih istraživača (Bogs i sar., 2007, 2005; Dixon i sar., 2005; Xie i sar., 2003; Winkel-Shirley, 2001; Boss i sar., 1996). Na slici 2.16 prikazana je fenolpropanoidna putanja biosinteze najznačajnih klasa fenolnih jedinjenja u organima vinove loze:



Slika 2.16: Fenolpropanoidna putanja biosinteze najznačajnijih klasa fenolnih jedinjenja u vinovoj lozi: ANR - antocijanidin reduktaza; CH - p-kumarat-3-hidroksilaza; C3H – cinamat-3-hidroksilaza; C4H – cinamat-4-hidroksilaza; CHI – halkon izomeraza; CHS – halkon sintetaza; DFR – dihidroflavonol-4-reduktaza; F3H – flavonon-3-hidroksilaza; F3'H – flavonon-3'-hidroksilaza; F3'5'H – flavonon-3',5'-hidroksilaza; FLS – flavonol sintetaza; LAR – leukoantocijanidin reduktaza; LDOX – leukoantocijanidin dioksigenaza; MT – metal transferaza; PAL – fenilalanin amonijum liaza; StSy – stilben sintetaza; UFGT=UDP – glikoza: flavonoid-3-O-glukozil transferaza (prerađena šema Kennedy, 2008)

Minerali (Possner i Kliewer, 1985), amino kiseline (Stines i sar., 2000), i jedinjenja koja daju aromu (npr. metokspirazini) javljaju se u fazi formiranja bobice (Allen i sar., 1989; Allen i Lacey, 1999).

Sledi druga faza: stagnacija u porastu kada nema nekih značajnijih promena u hemijskom sastavu bobice.

Šarak - *véraison* označava početak treće faze, perioda povećanja zapremine postojećih ćelija i akumulacije ugljenih hidrata. Koncentracija kalijuma, amino kiselina i fenolnih jedinjenja

se povećava, a koncentracije jabučne i vinske kiseline se smanjuju, dok se aroma razvija. Ovo je faza zrenja bobica i traje sve do berbe.

Bobice udvostruče svoju veličinu od početka treće faze do berbe. Mnoge hranljive supstance koje se akumuliraju za vreme prvog perioda razvoja ostaju do berbe, s tim što se njihova koncentracija znatno smanjuje zbog povećanja zapremine bobica. Koncentracija jabučne kiseline i tanina smanjuje se u ovom periodu. Smanjenje tanina u semenkama javlja se zbog oksidacije kako tanini postaju fiksirani za semenjaču (Kennedy i sar., 2000). Tanini u pokožici takođe se smanjuju ili ostaju konstantni i modifikuju se povećanjem svoje veličine sa pektinima i antocijanima (Kennedy i sar., 2001). Metokspirazini se smanjuju za vreme druge faze porasta bobice (Hashizume i Samuta, 1999). Ugljeni hidrati počinju da se akumuliraju u bobicama od šarka-*véraison*. Saharoza se stvara u procesu fotosinteze, većim delom u listovima, manjim u samim bobicama. Iz listova transportuje se do bobica tokom zrenja i putem hidrolize izdvaja se glukoza i fruktoza (Robinson i Davies, 2000). U ovom periodu kod crnih sorti se akumuliraju antocijani u pokožici bobice, a kod belih hlorofil se transformiše u ksantofil što bobicima daje žutu boju. Isparljiva jedinjenja (terpenoidi) odgovorna za aromu, stvaraju se u ovoj fazi (Dimitriadis i Williams, 1984; Marais, 1983 i 1994; Park i sar., 1991; Wilson i sar., 1984). Manji je broj sorti poznatih kao bojadiseri, gde se antocijani stvaraju i u pokožici i pulpi (Dimitriadis i Williams, 1984; Marais, 1983 i 1994; Park i sar., 1991).

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH JEDINJENJA IZ VINOVE LOZE

Činjenica da biljke sadrže nekoliko hiljada sekundarnih metabolita stvara potrebu za razvojem brze i precizne ekstrakcione metode (Mondal i sar., 2007).

Razvijeno je dosta procedura za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitog biljnog materijala u zavisnosti od konkretnih zahteva istraživanja. Waterman i Mole, 1994 pronašli su 33 različite ekstrakcione procedure publikovane u različitim biohemijskim istraživanjima. Ove procedure razlikuju se u vremenima ekstrakcije (od 30 s do 96 h, pa i nekoliko dana) i odnosu zapremine rastvarača mase uzorka (od 2 do 200) (Bohm, 1998).

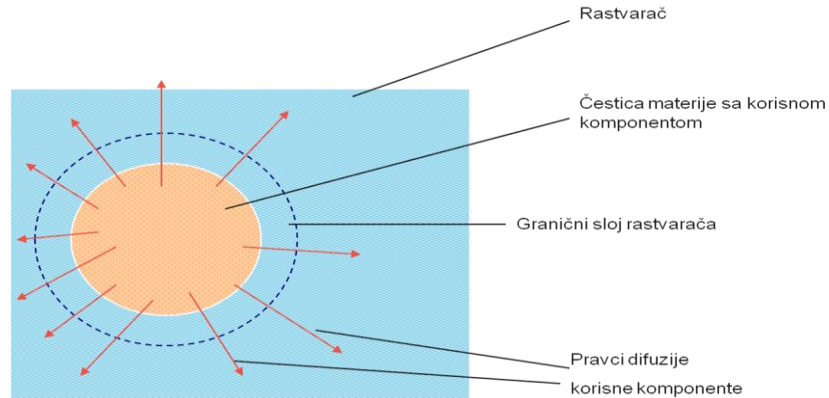
Tradicionalne metode ekstrakcije uključuju čvrsto-tečno, tečno-tečno, Soxhlet ekstrakciju i sl. Ove metode karakteriše upotreba velike količine rastvarača, duže vreme trajanja ekstrakcije i

povećani rizik degradacije nestabilnih komponenti. Soxhlet ekstrakcija često se upotrebljava bez obzira što zahteva duže vreme ekstrahovanja (24 h i više) i visoku potrošnju energije. Pored toga, produženo ekstrahovanje ozbiljno smanjuje protok uzorka, što je velika obaveza u smislu komercijalne primene.

U poslednje vreme traže se nove alternativne ekstrakcione procedure koje bi smanjile vreme ekstrahovanja i količinu potrebnog rastvarača, povećale protok kroz uzorak i povećale prinos. Neke od ovih metoda uključuju superkritičnu fluid ekstrakciju (eng. supercritical fluid extraction - SFE), ubranu ekstrakciju rastvaračima (eng. accelerated solvent extraction - ASE), mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. solid-phase microextraction - SPME), ultrazvučnu ekstrakciju (eng. ultrasound-assisted extraction - UE) i mikrotalasnu ekstrakciju (eng. microwave-assisted extraction - MAE). Gao i Liu, 2005 su upoređivanjem MAE i UE sa tradicionalnijim metodama ekstrakcije flavonoida iz biljne mase zaključili da je MAE imala najveću efikasnost u ekstrakciji flavonoida.

2.4.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno

Ekstrakcija čvrsto-tečno, takođe se često naziva maceracija i izluživanje (eng. leaching), uključuje uklanjanje željene komponente (rastvorene supstance) iz biljnog materijala korišćenjem tečnosti (rastvarača) sposobne da rastvori tu komponentu (Fellows, 2000). Ona se dakle zasniva na difuziji korisne komponente iz unutrašnjosti same noseće materije u rastvarač koji je u stalnom dodiru sa materijom i selektivan je prema korisnoj komponenti (slika 2.17). Difuzija traje sve dok postoji razlika u koncentraciji (Δx) korisne komponente u samoj nosećoj materiji i rastvaraču. Difuzija supstance iz čvrstog materijala u rastvarač dešava se u četiri faze: (1) rastvarač prodire u čvrsti matriks, (2) supstanca se rastvara u rastvarač, (3) rastvor se kreće kroz čvrsti matriks do njegove površine i (4) rastvor postaje dispergovan u masi rastvarača (Fellows, 2000). Vreme neophodno da rastvarač stupi u interakciju sa čvrstim biljnim materijalom kritično je za ekstrakciju i zavisi ne samo od rastvorljivosti supstance, već i od ekstrakcione temperature, površine materijala koji se ekstrahuje, viskoziteta i brzine protoka rastvarača (Fellows, 2000).



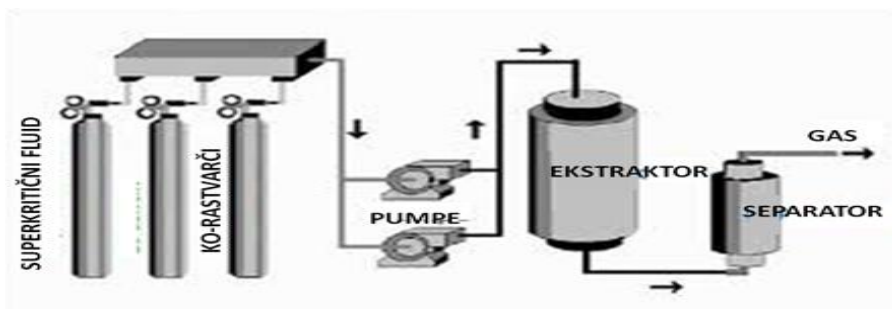
Slika 2.17: Tok ekstrakcije

Ekstrakcija čvrsto-tečno jedna je od najstarijih tehnika koja se koristila mnogo godina u ekstrakciji šećera iz šećerne repe i separaciju minerala iz svojih ruda.

Za ekstrakciju fenola koriste se polarni rastvarači kao što su voda, metanol, etanol, aceton i njihova smeša. U literaturi su kontradiktorne informacije o efikasnosti ovih rastvarača za ovu tehniku. Izbor rastvarača zavisi od mnogih predhodno pomenutih faktora uključujući sposobnost rastvarača da rastvori supstancu, temperaturu na kojoj se izvodi ekstrakcija i veličina čestica biljnog materijala.

2.4.2. Superkrična fluid ekstrakcija (SFE)

Superkrična fluid ekstrakcija je ekstrakciona tehnika gde se odvajaju željene komponente iz čvrstog ili tečenog materija korišćenjem superkričnog fluida kao rastvarača za ekstrakciju (slika 2.18). Termin superkrični se koristi da opiše svaki fluid koji postoji na temperaturi i pritisku iznad njegove kritične tačke. Na kritičnoj tački, tečne i gasovite faze supstance se ne razlikuju i fluid ispoljava svojstva i kao tečnost i kao gas. Fazni dijagram se često koristi za predstavljanje faza supstance i za uslove pod kojima svaka faza postoji. Ugljen dioksid najčešće se koristi kao rastvarač SFE. Wegova niska kritična temperatura (31,06 °C) i pritisak (73 atm) čine ga izuzetno korisnim za upotrebu za SFE.



Slika 2.18: Tok superkritične fluid ekstrakcije

U superkritičnom regionu, CO₂ difunduje kao gas, dozvoljavajući mu da prodire lako u čvrsti matriks a sposoban je da rastvori supstancu kao tečnost. Kada je CO₂ ili druga supstanca u blizini svoje kritične tačke, male varijacije u temperaturi i pritisku imaju veliki uticaj na gustinu fluida. Rastvorljivost jedinjenja superkritičnim fluidom teži da se poveća sa povećanjem gustine fluida. Kada se pritisak poveća iznad kritičnog pritiska, gustina fluida se povećava; dakle rastvorljivost se povećava sa povećanjem pritiska. Na ovaj način, selektivnost rastvarača prema određenom jedinjenju može se podesiti jednostavno malim promenama pritiska. Sposobnost da se kontroliše rastvorljivost preko pritiska je jedna od karakteristika po kojoj se razlikuju superkritični fluidi od tradicionalnih rastvarača (Steytler, 1996). Uticaj temperature na rastvorljivost nije tako jednostavan. Uglavnom je primećeno da se sa povećanjem temperature rastvorljivost tečnih rastvarača povećava. Situacija sa superkritičnim fluidima kompleksnija je i za temperaturu i za pritisak i mora se uzeti u obzir kada se određuje rastvorljivost (Steytler, 1996). U blizini kritične tačke, čak i malo povećanje temperature može izazvati značajno smanjenje gustine tj. moći rastvaranja. Međutim, na ili iznad kritične tačke, može se uopšteno zaključiti da rastvorljivost superkritičnih fluida raste sa povećanjem temperature pri konstantnoj gustini (Steytler, 1996). Često superkritični fluidi međusobno nisu pogodni za ekstrakciju polarnijih sastojaka kakvi su polifenoli. Ovaj problem se može prevazići upotrebom modifikatora-rastvarača kao što su etanol ili metanol koji mogu značajno da povećaju rastvorljivost polarnih supstanci u superkritičnim fluidima (Palma i sar., 1999). Međutim, upotreba modifikatora znači da je potreban dodatni korak prečišćavanja da se odvoji zaostali rastvarač (npr. metanol) ako je krajnji produkt namenjen za konzumiranje.

Ugljen dioksid i voda su dva fluida koja se najčešće upotrebljavaju za SFE. Upotreba superkritičnog ugljen dioksida ima mnoge prednosti uključujući činjenicu da je netoksičan, nezapaljiv, inertan prema mnogim materijalima i dostupan sa visokim procentom čistoće i minimalnom cenom (Ge i sar., 2002). On se lako može odstraniti od rastvorenih supstanci nakon ekstrakcije ne ostavljajući hemiske ostatke koji su problem prilikom korišćenja tradicionalnih metoda ekstrakcije. SFE nudi dodatne pogodnosti u odnosu na konvencijalne metode na taj način što se ekstrakcija odigrava u odsutnosti kiseonika i svetlosti što smanjuje šanse za oksidativnu degradaciju fitohemikalija. Ipak, najveći problem u široj komercijalnoj primeni jesu velika finansijska ulaganja koja zahteva SFE oprema.

Neki autori su koristili SFE za ekstrakciju fenola iz brojnih produkata uključujući i semenke grožđa (Palma i sar., 1999; Murga i sar., 2000; Ashraf-Khorassani i Taylor, 2004).

2.4.3. Ubrzana ekstrakcija rastvaračem

Ubrzana ekstrakcija rastvaračem (eng. Accelerated Solvent Extraction - ASE) zahteva visoku temperaturu (50-200°C) i pritisak (5-200 atm) za ekstrakciju analita iz matriksa uzorka (slika 2.19). Izvodi se na temperaturama znatno iznad tačke ključanja rastvarača. Povećanje temperature utiče na povećanje rastvorljivosti ciljnih komponenti, povećanje brzine difuzije, slabljenje molekulskih interakcija (van der Valsove sile) između ciljnih komponenti i matriksa, i smanjenje viskoziteta i površinskog napona rastvarača, što poboljšava prodor rastvarača u matriks i na taj način vodi povećanju prinosa mase (Giergielewicz-Moajska i sar., 2001). Kao rezultat rada na visokim temperaturama pri upotrebi ASE, visoki pritisak (5-200 atm) se mora upotrebiti u ekstrakcionoj ćeliji da bezbedi da rastvarač ostane u tečnom stanju. Upotreba visokog pritiska takođe znatno povećava efikasnost ekstrakcije guranjem rastvarača u pore uzorka, omogućujući rastvaraču pristup ciljnim komponentama (Giergielewicz-Moajska i sar., 2001).



Slika 2.19: Aparat za ubrzanu ekstrakciju rastvaračem

ASE (takođe poznata kao ekstrakcija fluidima pod pritiskom ili tečna ekstrakcija pod pritiskom) prvi put je izvedena 1995 (Giergielewicz-Mozajska i sar., 2001), i zbog toga, to je relativno nova tehnika. Uglavnom se koristi za izdvajanje organskih jedinjenja iz prirodnih uzoraka (Heemken i sar., 1997). Jedna od prednosti ASE u odnosu na konvencionalne metode je znatno smanjenje vremena ekstrakcije (5 do 15 min). Ona dozvoljava upotrebu širokog opsega rastvarača, čak i onih koje nisu efikasne kod tradicionalnih metoda ekstrakcije. Pored tih prednosti pri upotrebi ASE, ona ima nekoliko ključnih nedostataka koji onemogućavaju njenu širu primenu. To su mala selektivnost ekstrahovanih komponenti, potreba za velikom količinom rastvarača i velika cena opreme za ekstrakciju.

2.4.4. Ultrazvučna ekstrakcija (UE)

Ultrazvuk je visokofrekventni zvuk (>20 kHz) koji je viši od gornje granice detekcije za čoveka. U industriji prerade hrane koriste se dva nivoa ultrazvuka: malog inteziteta (< 1 W/cm²) i visokog inteziteta ultrazvuka (10-1000 W/cm²). UE uključuje prolaz ultrazvučne energije u obliku talasa kroz tečni rastvarač koji je pomešan sa čvrstim česticama. Kako talasi pogode površinu materijala, stvara se sila koja je normalna ili paralelna sa površinom. Ako je sila normalna na površinu, formira se kompresivni talas, a ako je sila paralelna sa površinom, stvara se ekspanzioni talas. Ovo konstantno stvaranje kompresivnih i ekspanzionih sila prerasta u fenomen poznat kao kavitacija. Júnior i sar. (2006) objašnjavaju da mehurići narastu za vreme ekspanzione faze zvučnih talasa i uruše se za vreme faze kompresije. Kada se uruše, zvučna energija se pretvara u mehaničku u formi udarnih talasa ekvivalentnih pritisku od nekoliko hiljada atm (do 100 MPa). Kavitacija se definiše kao ceo process nastajanja mehurića, rasta i nestajanja (Júnior i sar., 2006). Veruje se da je brzo lokalizovano povećanje pritiska i

temperature odgovorno za narušavanje ćelijskih membrana, što ubrzava curenje željenih komponenti iz ćelija i migraciju rastvarača u ćelije.



Slika 2.20: Aparati za ultrazvučnu ekstrakciju: ultrazvučna sonda (levo) i ultrazvučna kadica (desno)

UAE je atraktivna tehnika za ekstrakciju u poređenju sa ostalim tehnikama zato što je relativno jeftina, ne zahteva skupu opremu. Ekstrakcija se izvodi upotrebom ultrazvučne sonde ili kadice (slika 2.20). Rostagno i sar. (2003) su koristili UE za ekstrakciju izoflavona iz soje, upotrebom 50% etanola kao rastvarača na 60°C za 20 min. Wang i sar. (2008) su koristili UAE za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz pšenične mekinje. Oni su koristili dizajn odgovora površine da odrede optimalne uslove ekstrakcije na osnovu ukupnog fenolnog sadržaja.

2.4.5. Mikrotalasna ekstrakcija (MAE)

Mikrotalasi su oblik nejonizacione elektromagnetne energije. Ova elektromagnetna energija može se absorbovati, odbiti ili preneti na material u obliku talasa na frekvenciji u opsegu od 300 MHz do 300 GHz. Kućne mikrotalasne rerne obično rade na frekvenciji od 2450 MHz a industrijske jedinice na 915 MHz. Mikrotalasna snaga koja se prenosi kroz masu materijala može se absorbovati ili pretvoriti u toplotu. Postoje dva predložena mehanizma mikrotalasnog zagrevanja: rotacija dipola i jonska polarizacija.

Mehanizam dipolne rotacije zasniva se na činjenici da mnogi molekuli postoje kao električni dipoli, što znači da molekuli imaju negativno i pozitivno naelektrisani kraj. Kada su postavljeni u elektromagnetno polje, dipoli teže da se orijentišu između sebe u skladu sa

polarnošću polja, koji se menja oko $4,9 \times 10^9$ puta u sekundi (Camel, 2000). Konstantna rotacija molekula izaziva frikciono zagrevanje.

Jonska polarizacija javlja se kada se jonska jedinjenja kao što su soli kreću ubrzanim tempom kao odgovor naizmeničnom električnom polju. Generisana kinetička energija nastala kretanjem jona pretvara se u termalnu energiju.

Postoje dva tipa mikrotalasne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontrolisanom pritisku i temperaturi, i u mikrotalasnim pećnicama pri atmosferskom pritisku (slika 2.21). Sistem mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenim posudama koristi se za ekstrakciju pri uslovima niske ili visoke temperature ekstrakcije.



Slika 2.21: Laboratorijska mikrotalasna pećnica

Interesovanje za MAE povećalo se zadnjih godina zbog nekih prednosti (smanjenje vremena ekstrakcije i količine rastvarača) u odnosu na kovencionalne ekstrakcione tehnike.

Izbor rastvarača i količina rastvarača su dva ključna faktora koja se moraju uzeti u obzir sa posebnom pažnjom kada se koristi MAE. Rastvarači koji se najčešće koriste za MAE su metanol (MeOH), etanol (EtOH), aceton, heksan, voda i njihova smeša. Visoka temperatura koja se dostiže sa mikrotalasnim zagrevanjem povećava moć rastvaranja većine rastvarača smanjenjem površinskog napona i viskoziteta rastvarača, što poboljšava kvašenje uzorka i prodiranje u matriks (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Li i sar. (2004) proučavali su parameter za MAE fenolnih kiselina (galne, protokatehinske, hlorogene i kafene kiseline) iz *E. ulmodies*, biljke koja se koristi u Kineskoj medicini. Najbolje rezultate postigli su sa 50% snage mikrotalasa, 30 s vreme izlaganja, i odnosom rastvarač/uzorak 10 ml/g. Takođe, primetili su da se upotrebom metanola dobija više

kiselina iz uzoraka nego čistom vodom, što je povezano sa većom vrednošću δ za metanol nego za vodu.

2.5. EKSTRAKCIJA ULJA IZ SEMENKI GROŽĐA

Semenke grožđa sadrže 10–20% ulja, koje se obično ekstrahuje rastvaračima i prečišćava pre upotrebe sa ciljem da se izdvoje neprihvatljivi materijali sa što manjim mogućim gubitkom ulja (Fernandez i sar., 2010). Od rastvarača najviše se koriste heksan (Baydar i sar., 2007), petroleum etar (Beveridge i sar., 2005). Ekstrakcija se najčešće izvodi u Soxlet-ovom aparatu (Baydar i sar., 2007; Fernandez i sar., 2010). Fernandez i sar., 2010 su ispitivali prinos ulja dobijenih ekstrakcijom pomoću različitih rastvarača (metanol, etanol, pentan, heksan, aceton, dietil etar) i njihovom kombinacijom, najbolje se pokazao heksan.

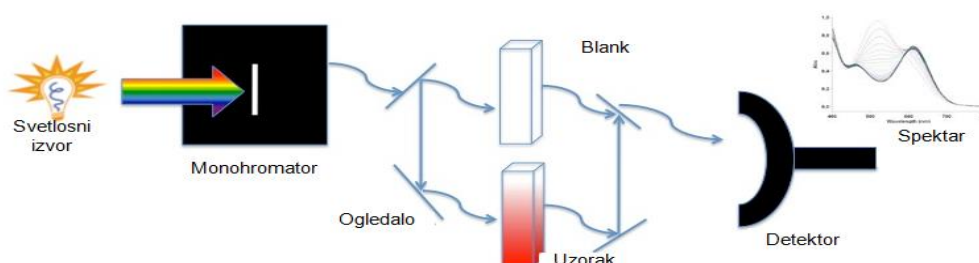
Ako želimo da dobijemo kvalitetno jestivo ulje visokog kvaliteta onda se koristi metoda hladnog ceđenja tj. presovanje semenki grožđa. Međutim, ovom metodom dobija se znatno manja količina ulja u odnosu na ekstrakciju rastvaračima pa se često koristi kombinovana metoda (Fernandez i sar., 2010). Kombinacija presovanja pa zatim ekstrakcija rastvarčem veoma je zastupljena, sa učešćem od blizu 50% u ukupnoj proizvodnji biljnog ulja (Bhosle i Subramanian, 2005).

Još jedna mogućnost je upotreba superkritičnih fluida za ekstrakciju ulja iz semenki grožđa, pre svega ugljen dioksida, gde se dobija prinos oko 13,6 i 12 %, respektivno (Beveridge i sar., 2005; Fiori, 2007).

2.6. ANALIZA FENOLNIH JEDINJENJA IZ VINOVE LOZE

Najčešća tehnika za brzo određivanje ukupnog fenolnog sadržaja jeste UV-VIS spektrofotometrijska analiza upotrebom Folin–Ciocalteu reagensa (Singleton i Rossi, 1965; Huang i sar., 2005). Na slici 2.22 dat je šematski prikaz glavnih delova i principa rada UV-VIS spektrofotometra. Obično se koristi galna kiselina kao standard, a fenolni sadržaj se izražava u mg/L ili mg/g ekvivalenta galne kiseline (GAE) nasuprot svežoj ili suvoj biljnoj masi (Garcia-

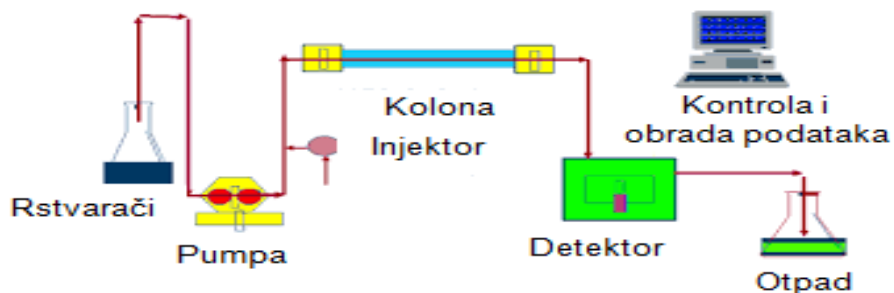
Alonso i sar., 2006; Radovanović i sar., 2009). U literaturi se mogu naći slične spektrofotometrijske metode pomoću kojih se pored ukupnog fenolnog sadržaja mogu odrediti ukupni sadržaj pojedinih klasa fenola kao što su flavanoli, hidroksicimetne kiseline (Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2010), flavan-3-oli (Terrill i sar. 1992), antocijani (Somers i Evans, 1976; Rigo i sar., 2000).



Slika 2.22: Šematski prikaz glavnih delova i principa rada UV-VIS spektrofotometra

Međutim za preciznije određivanje fenolnog sadržaja kao i identifikaciju i određivanje koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja najviše se koristi HPLC sa različitim detektorima. Šema glavnih delova i principa rada HPLC aparature prikazana je na slici 2.23. Za razdvajanje fenolnih jedinjenja se najčešće koristi kolona sa obrnutim fazama (Reversed phase - RP). Kao detektori najčešće se koriste UV/Vis spektrofotometar ili detektor sa nizom fotodioda (PAD) (Revilla i Ryan, 2000; Chafer i sar., 2005; Spranger i sar., 2008; Amico i sar., 2008; Radovanović i sar., 2010), maseni spektrometar (MS) (Rubilar i sar., 2007; Serra i sar., 2009) i fluorescentni detektor (FLD) (Radovanović i sar., 2010).

Pored gore navedenih tehnika za identifikaciju nepoznatih fenolnih jedinjenja najčešće se uključuje i nuklearno magnetna rezonancija (NMR) (De Freitas, 1995; Kennedy i sar., 2001).



Slika 2.23: Šematski prikaz glavnih delova i principa rada HPLC aparature

2.7. ANALIZA ULJA IZ SEMENKI GROŽĐA

Za analizu masnih kiselina i isparljivih komponenti iz ulja dobijenog ekstrakcijom iz semenki grožđa i drugog biljnog materijala najčešće se koristi gasna hromatografija (GC) najčešće povezana sa plamenim detektorom (FID) ili masenim detektorom (MS) (Mielnil i sar., 2006; Baydar i sar., 2007; Coelho i sar., 2007; Yi i sar., 2009; Fernandez i sar., 2010; Mironeasa i sar., 2010).

Od spektroskopskih tehnika koriste se infracrvena spektrometrija sa Furijeovom transformacijom (FTIC) (Marigheto i sar., 1998; Ozen i Mauer, 2002; Rohman i Che Man, 2009), Ramanova spektrometrija (Marigheto i sar., 1998; El-Abassy i sar., 2009) i NMR-a) (Baydar i Akkurt, 2001; Zamora i sar., 2001).

Analiza fenolnih jedinjenja i tokoferola iz ulja izvodi se najčešće HPLC-UV (Baydar i sar., 2007) tehnikom, a od spektroskopskih najviše se koristi UV-VIS (Baydar i Akkurt, 2001).

2.8. UPOTREBA VINOVE LOZE U TRADICIONALNOJ MEDICINI

Upotrebu vinove loze u medicini poznavali su stari Egipćani i stari Grci (McGovern, 1995). Sok, isceden iz zeljastih izdanaka, tada je korišćen kao popularan lek protiv raznih kožnih bolesti.

Listovi su, zbog adstringentnih i hemostatičkih svojstava, često korišćeni u lečenju dijareja, hemoragija, proširenih vena i hemoroida. U različitim krajevima sveta postoje informacije o tradicionalnoj upotrebi lista i ploda vinove loze u lečenju groznice, oboljenja jetre, protiv skorbuta i difterije, protiv poremećaja nastalih usled nedostatka gvožđa (prvenstveno kod male dece), kao analgetik protiv bolova različite etiologije i dr (Chevallier, 1996). Tako u Evropi, a i u našoj narodnoj medicini često je korišćen list, u lečenju poremećaja menstrualnog ciklusa žene, dijareje, krvarenja, hemoroida, proširenih vena i drugih bolesti krvotoka ali i protiv kamena i peska u bubrežima (Bombardelli i Morazzoni, 1995; Lardos i Krauter, 2000; Orhan i sar., 2009; Pari i Suresh, 2009).

Za lečenje upala grla, često je ceđen sok zelenih plodova korišćen za ispiranje. Osušeni zreli plodovi korišćeni su kao blagi laksans, ali i za podsticanje izlučivanja urina, za olakšavanje

iskašljavanja, za poboljšanje apetita i za podizanje tonusa organizma, kod izgladnelosti, oticanja ekstremiteta, dijareja, mučnina i različitih oboljenja kože, bubrega i jetre.

U Ajurvedi, drevnom holističkom indijskom sistemu lečenja, korišćeni su plodovi crnog grožđa kao afrodizijak, diuretik, laksans, protiv astme, groznice, oboljenja očiju, žutice i upala grla (Pari i Suresh, 2009).

Farmakološka vrednost vina je takođe poznata još iz antičkih vremena. Starogrčki lekari – Hipokrat i Galen – koristili su adstringentno i toničko delovanje crnog vina u lečenju mnogih oboljenja, dok je belo vino obično korišćeno kao diuretik.

Ulje, dobijeno ceđenjem semena grožđa, korišćeno je kao laksans, antacid, protiv opekotina i površinskih ozleda kože, ali i za podsticanje lučenja žuči.

2.9. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI RAZLIČITIH ORGANA VINOVE LOZE

Vinova loza je kao lekovita biljka u žiži interesovanja istraživača došla polovinom 20. veka, zahvaljujući tzv. “francuskom paradoksu”: iako je ishrana Francuza bogata mastima, a koncentracija serumskog holesterola približna kao kod drugih naroda, mortalitet od koronarnih oboljenja značajno je niži nego u drugim industrijskim zemljama. Ovaj fenomen objašnjen je antioksidativnim svojstvima polifenola grožđa i vina, koje u ishrani Francuza ima značajnu ulogu. U ovom pogledu, najveću pažnju istraživača privukli su fitoaleksini (resveratrol i viniferini), antocijanini i, naročito, procijanidini.

Povećanim interesovanjem za istraživanja fenolnih jedinjenja iz grožđa otkrivena je njihova jaka biološka aktivnost povezana sa uticajem na zdravlje čoveka, kao što su antioksidativna, kardiozaštitna, antitumorna, antizapaljenska, antimikrobna svojstva i zaštita od starenja.

2.9.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna svojstva fenola iz vinove loze su pored ostalih bioloških svojstava najproučavanija. Ona uključuju sledeće karakteristike: hvatanje slobodnih radikala, inhibicija

lipidne oksidacije, redukcija formiranja hiperperoksida, itd. (Sato i sar., 1996; Meyer i sar., 1997). Nekoliko metoda je razvijeno za procenu antioksidativnog kapaciteta fenolnih jedinjenja iz vinove loze kao što su: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (eng. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) - DPPH test (Brand-Williams i sar., 1995), kapacitet absorbance kiseoničnog radikala (oxygen radical absorbance capacity) - ORAC (Prior i sar., 2003), obezbojavanje krocina (crocin bleaching assay) – CBA test (Chatterjee i sar., 2005), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (eng. 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) - ABTS test (Cano i sar., 1998), antioksidativni kapacitet određen preko ekvivalenata troksa (Trolox equivalent antioxidant capacity) - TEAC (Wang i sar., 2004), antioksidativna snaga određena sposobnošću redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+} (ferric reducing antioxidant power) - FRAP (Benzie i Strain, 1996) i metode inhibicije lipidne peroksidacije (Esterbauer i sar., 1989; Dapkevicius i sar., 1998; Park i sar., 2002). Korišćenjem ovih metoda, značajna antioksidativna aktivnost pronađena je u grožđu, vinu, soku i ekstraktima iz različitih delova vinove loze. Vrednosti antioksidativnog kapaciteta dosta su različite u tim istraživanjima. Najveći antioksidativni kapacitet pokazali su ekstrakti semenki, pa zatim pokožice i pulpe (mesa) bobice grožđa (Pastrana-Bonilla i sar., 2003).

Mnogi istraživači pokušali su da otkriju koja fenolna jedinjenja uglavnom utiču na antioksidativnu aktivnost ovih ekstrakta. Neki rezultati ukazuju da fenoli imaju koncentracijsku granicu zasićenja, gde se iznad nje, daljim povećanjem njihove koncentracije ne povećava antioksidativna aktivnost (Dani i sar., 2009). Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja uslovljena je različitim faktorima (Majo i sar., 2008; Radovanović i sar., 2009). Jedna studija je pokazala da su antocijani odgovorni za jaku antiradikalnu aktivnost ekstrakata (Falchi i sar., 2006), a druga, da su odgovorni flavanoli (Arnous i sar., 2002). Ekstrakti semenki grožđa koji imaju najviše prisutnih flavan-3-ola su pokazivali najjači antioksidativni kapacitet (Yilmaz i Toledo, 2004; Soobrattee i sar., 2005; Faria i sar., 2006; Spranger i sar., 2008). Antioksidativna aktivnost uzoraka bi se možda bolje objasnila sinergijskim efektom više komponenti nego jednom (Monagas i sar., 2005; Maier i sar., 2009; Radovanović i sar., 2009).

Pinelo i sar. proučavali su uticaj rastvarača na antioksidativnu aktivnost katehina, resveratrola i ekstrakata grožđa rastvorenih u etanolu, metanolu i vodi. Najjaču antiradikalnu aktivnost pokazao je ekstrakt sa etanolom, pa metanolom, a minimalnu sa vodom (Pinelo i sar., 2005). Antioksidativne karakteristike fenolnih jedinjenja najviše se pripisuju njihovom sposobnošću da hvataju slobodne radikale i vezuju metale (Dell Agli i sar., 2005; Soobrattee i

sar., 2005). Arora i sar. (1998) utvrdili su da flavonoidi pokazuju jači antioksidativni kapacitet prema peroksidaciji izazvanoj metalima nego peroksi radikalima. Pretpostavlja se da fenoli direktno reaguju sa metalima i stvaraju fenoksi radikale (Yoshimura i sar., 2003), koji su veoma stabilni i prekidaju lančanu reakciju. OH funkcionalna grupa fenolnih jedinjenja odgovorna je za antioksidativni kapacitet. Broj OH grupa i njihov položaj u prstenu fenola određuje njihov antioksidativni kapacitet (Arora i sar., 1998).

2.9.2. Kardiozaštitna aktivnost

S obzirom na jaku antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja iz vinove loze javila se potreba da se istraži i zaštitna moć ovih jedinjenja za kardiovaskularne bolesti. Zbog te činjenice a i Francuskog paradoksa sve više je literaturnih podataka o ispitivanjima kardiozaštitne aktivnosti fenolnih jedinjenja iz vinove loze (Auger i sar., 2004 i 2005; Dell Agli i sar., 2005; Tsanga i sar., 2005; Castilla i sar., 2006; Garcia-Alonso i sar., 2006; Cetin i sar., 2008).

Hiperlipemia nakon obroka i oksidativni stres prepoznati su kao faktori rizika za arterosklerozu i mogu se znatno redukovati upotrebom ekstrakta grožđanih semenki i sokom od grožđa bogatim fenolima. Faktori oksidativnog stresa pripisuju se lipidnim hidroperoksidima plazme, lipidnim peroksidnim produktima seruma, malondialdehide-modifikovanim-LDL (MDA-LDL). Fenoli vezani za lipide povećavaju se u serumu gde su nađeni čak i dva sata nakon unosa fenola, a MDA-LDL detektovan je nakon šest nedelja (Garcia-Alonso i sar., 2006). Ekstrakti grožđanih semenki pokazali su vrlo dobre rezultate u kardiozaštiti u *in vivo* eksperimentima (Auger i sar., 2004 i 2005; Cetin i sar., 2008).

Dell Agli i sar. (2005) pokazali su da antocijani iz vina i pokožice bobice inhibiraju aktivnost fosfodiesteraze-5, što redukuje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Falchi i sar. (2006) našli su da upotreba i drugih delova vinove loze kao što su ekstrakti pulpe i pokožice bobice takođe stvara kardiozaštitu. Castilla i sar. (2006) utvrdili su da fenolna jedinjenja značajno smanjuju koncentraciju lipida plazme. Konzumiranje crvenog vina rezultovalo je visokom koncentracijom HDL holesterola (Tsanga i sar., 2005), što je povezano sa smanjenjem rizika od koronarnih srčanih bolesti. Tsang i sar. (2005) pokazali su da se nakon dve nedelje dnevnog unosa crvenog vina (375 mL), maksimalna koncentracija konjugovanih diena i TBAES u Cu-oksidovanim LDL smanjila. Objavljeno je da konzumiranje crvenog vina smanjuje oksidativni

stres prouzrokovan Cu-oksidoanim LDL i povećava koncentraciju HDL holesterola. Pokazano je takođe da sok od grožđa potpuno inhibira Cu-oksidoan LDL na koncentraciju od 0.01% (Kulisic-Bilusic i sar., 2009). Fenolna jedinjenja u grožđu su se pokazala kao veoma efikasna za regulaciju lipida plazme i oksidativnog stresa.

2.9.3. Antikancerogena aktivnost

Ima dosta dokaza koji pokazuju da ekstrakti vinove loze i njenih proizvoda pokazuju antkancerogenu aktivnost. Antikancerogena aktivnost fenolnih jedinjenja široko je proučavana (Bagchi i sar., 2004; Faria i sar., 2006; Fan i Lou, 2008). Extract iz komete grožđa inhibira aktivnosti matriksa metaloproteinaza-2 i -9, i ispoljava značajni antiproliferativni uticaj na ljudski klon adenokarcinomnih ćelija (Caco-2) (God i sar., 2007; Lazze i sar., 2009). Fenoli iz soka grožđa takođe značajno inhibiraju formiranje kancerogenih-DNA adukata u modelima sa pacovima (Jung i sar., 2006), i DNA sintezu u ćelijama carcinoma dojke (Singletary i sar., 2003). Proučavana je takođe i povezanost antikancerogene aktivnosti i strukture fenolnih jedinjenja (Hudson i sar., 2007; Qian i sar., 2009).

2.9.4. Antizapaljenska aktivnost

Fenolna jedinjenja vinove loze, posebno semenke grožđa, pokazala su značajne anti-inflamatorne efekte na pacove, miševе i ljude (Panico i sar., 2006; Chacona i sar., 2009; Terra i sar., 2009). Flavonoli, flavanoli i procijanidini su najverovatnije sa najvećim uticajem na ove efekte (Panico i sar., 2006; Chacona i sar., 2009; Terra i sar., 2009). Fenoli grožđa ispoljavaju anti-inflamatorne efekte preko imunomodulacije i antioksidativnim delovanjem (Li i sar., 2001; Panico i sar., 2006; Chacona i sar., 2009). Rezultati Terra i sar. (2009) ukazuju da proantocijanidi iz grožđa inhibiraju upalu na nivoima mRNA, što vodi smanjenju rizika od bolesti povezanih upotrebom masne hrane i gojaznošću, kao što su kardiovaskularni i metabolički poremećaji.

2.9.5. Aktivnost u sprečavanju starenja

Zbog značajne antioksidativne aktivnosti fenoli mogu da zaštite organe i tkiva od oksidativnih oštećenja i izmene negativan mehanizam redoks statusa. Dosta je *in vivo* eksperimenata koji dokazuju da konzumiranje grožđa i proizvoda od grožđa inhibiraju procese starenja (Balu i sar., 2005 i 2006; Shukitt-Hale i sar., 2006). Balu i sar. (2005) našli su smanjenu učestalost lipidne peroksidacije, izazvane slobodnim radikalima, u centralnom nervnom sistemu starih pacova.

2.9.6. Antimikrobna aktivnost

Pokazano je da polifenoli iz biljaka pokazuju antibakterijsku (Balu i sar., 2005; Baydar i sar., 2006; Garcia-Alonso i sar., 2006), antifungicidnu (Jung i sar., 2005; Bruno i Sparapano, 2007) i antiviralnu (de Bruyne i sar., 1999; Chavez i sar., 2006) aktivnost.

Fenolna jedinjenja iz različitih delova vinove loze pokazuju različite antimikrobne efekte. Neki istraživači pokazali su da ekstrakti semenki imaju najveću moć inhibicije mikroba nego ostali delovi grožđa. Pregledom literature može se uočiti značajni antimikrobni potencijal fenolnih jedinjenja iz semenki (Jayaprakasha i sar., 2003; Anastasiadi i sar., 2009; Rotava i sar., 2009), pokožice (Brown i sar., 2009), peteljke (Anastasiadi i sar., 2009), vina (Radovanović i sar., 2009) i komine (Thimothe i sar., 2007). Pokazano je čak da je antimikrobna aktivnost komine značajno jača nego ekstrakta cele bobice grožđa (Thimothe i sar., 2007). Ekstrakti pulpe grožđa nisu pokazali antioksidativnu aktivnost (Yigit i sar., 2009).

Fenolna jedinjenja iz vinove loze kao što je resveratrol pokazala su potencijal kao inhibitori fungalnih mikroba kao što je ljudska patogena vrsta *Candida albicans* pri koncentraciji od 10–20 µL (Jung i sar., 2005).

Ova istraživanja ukazuju na mogućnost potencijalne primene raznih ekstrakata vinove loze kao prirodnih konzervansa u industriji hrane.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJALI

Ogledom su obuhvaćene dve sorte: autohtona Vranac i introdukovana Merlo. Eksperimentalni vinograd nalazi se Leskovačkom rejonu, Vinaračko vinogorje, Zalužnje (www.popispoljoprivrede.gov.rs).

Sorta Vranac potiče iz Crne Gore, široko je rasprostranjena u Srbiji i Makedoniji. Glavni razlog rasprostranjenosti je redovna i obilna rodnost uz izvrstan kvalitet grožđa. Grozd je krupan, do 300 g, srednje rastresit, sa sitnim okruglim bobicama, tolerantan na sivu plesan (slika 3.1). U uslovima Vinaračkog vinogorja sazreva u trećoj epohi, krajem septembra. U sazrelom grožđu nakupi i do 24% šećera. U kontinentalnim uslovima zimska okca u periodu dubokog zimskog sna stradaju već na -12°C . Vino je intenzivno obojeno, pitko, harmonično sa posebnim svojstvima.



Slika 3.1: Sorta Vranac

Sorta Merlo (primarno ime *Merlot*) poreklom je iz Francuske. U Bordou je zastupljeno pet crnih i tri bele vinske sorte. Merlo sa sortama Kaberne sovinjonom i Kaberne frank pokriva 90% od 120.000 ha koliko je pod vinogradima u ovom regionu (Wilson, 1998). U svetu, prema podacima iz 2004. godine, Merlo je sorta treća po rasprostranjenosti sa približno 640.000 ha. U našoj zemlji ova sorta je rasprostranjena u regionu Centralne Srbije, Vojvodine, Kosova i Metohije (Ivanišević i sar., 2015).

Primenom analize DNK utvrđeno je da je sorta Merlo dobijena spontanom ukrštanjem sorti *Magdeleine Noire des Charente* (majka) i *Cabernet Frank* (otac) u Bordou. U genetskom smislu bliska je sorti Cabernet Sauvignon, ali sazreva neznatno ranije, bobica ima tanju pokožicu, odlikuje se manjim sadržajem bojenih materija u pokožici, a ukus bobice podseća na borovnicu i mentu. Ipak najveća sličnost zapravo je sa sortom *Karmenjere* (primarno ime Carménère) koju u novije vreme ubrajaju kao šestu crnu vinsku sortu Bordoa, a koja je danas veoma raširena u Čileu. Od sorte *Merlo* se pravi najskuplje vino na svetu – Chateay Petrus. Galet (2002) ističe da je početkom 19. veka Merlo bio druga po značaju sorta u Bordou. Prisustvo sorte Merlo u lokalitetu Medoc Grandoc Crus je prvi put zavedeno u ampelografski registar 1857. godine.

Merlo je srednje prinosa sorta, grozd je srednje krupan, valjkast, bobice su srednje krupne, okrugle. Da bi se poboljšala rodnost prvi koraci u klonskoj selekciji s kraja šezdesetih godina prošlog veka, upravo su vezani za Merlo pokožica je tamno plave boje sa izraženim pepeljkom, tanka i zato osetljiva na sivu plesan. Po otpornosti na niske temperature u periodu dubokog zimskog sna Merlo pripada grupi otpornih sorti, tek na temperaturi nižoj od -23°C zimska okca stradaju. U bobicama se u fazi pune zrelosti nakupi i do 24% šećera. Vina su obojena, harmonična, veoma osvežavajuća i imaju ukus i miris na bobičasto voće.



Slika 3.2: Sorta Merlo

Pored plodova, za analizu sa istog vinograda sakupljani su uzorci zdravih i zaraženih listova vinove loze (slika 3.3) plamenjačom vinove loze (*Plasmopara viticola* Berk. & M.A. Curtis Berl. & De Toni).



Slika 3.3: List vinove loze sorte Vranac: nezaražene (levo) i zaražene biljke plamenjačom vinove loze (desno)

Za analizu je korišćena i komina dobijena preradom grožđa sorte Vranac (slika 3.4) koja nastaje kao sekundarni proizvod nakon procesa vinifikacije.



Slika 3.4: Komina grožđa sorte Vranac

3.2. APARATI

- UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) sa dužinom optičkog puta 1 cm za brzu analizu ukupnog fenolnog sadržaja i ispitivanje antioksidativne aktivnosti;

- HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) koji se sastoji od kvaternerne pumpe G1354A, automatskog injektora G1329A, termostativanog kolonskog dela G1316A, UV/Vis detektora G1315D, fluorescentnog detektora G1321A kontrolisanog sa HP Chemstation softverom, za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja;
- GC-MS sistem (Agilent Technologies, USA) za određivanje sastava ulja;
- NMR spektrometar Varian GEMINI-200 MHz za analizu biodizela;
- MicroMed high purity water system (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka), TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH za dobijanje demineralizovane vode;
- Analitička vaga AB-204-S (Mettler Toledo, Švajcarska) za odmeravanje čvrstih supstanci;
- pH metar (Hanna Instruments, USA) za merenje pH vrednosti rastvora;
- Abeov refraktometar (Carl Zeiss Jena, Nemačka) za određivanje °Birix;
- Automatske pipete Labopette (Hirschmann Laborgerate, Nemačka) za pipetiranje rastvora;
- Električni blender (Braun, Nemačka) za homogenizovanje uzoraka;
- Magnetna mešalica;
- Ultrazvučno kupatilo 3L 500W40Hz (EI Niš, Srbija).

3.3. HEMIKALIJE I REAGENSI

Metanol, acetonitril, mravlja kiselina i sirćetna kiselina HPLC čistoće su nabavljeni od proizvođača Merck (Darmstadt, Nemačka). Galana kiselina, kafena kiselina, t-kutarna kiselina, p-kumarna kiselina, malvidin-3-monoglukozid hlorid, cijanidin-3-glukozid hlorid, (+)-katehin, procijanidin B2, (-)-epikatehin, (-)-epikatehingalat, kvercetin, rutin, kvercetin-glukozid, luteolin-glukozid, miricetin-glukozid, kaemferol-glukozid i 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal su nabavljeni od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Korišćeni reagensi su analitičke čistoće. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti 0,05 µS/cm.

3.4. PRIPREMA UZORAKA

Reprezentativni uzorci grožđa Vranac i Merlo su sakupljeni u vreme berbe (druga polovina septembra i prva polovina oktobra) sa istih markiranih čokota vinograda tokom četiri uzastopne sezone od 2009 do 2012. godine. Takođe, za praćenje optimalnog vremena zrelosti grožđa uzorci su sakupljeni svakih 10 dana nakon *véraison*. Svi uzorci su oprani destilovanom vodom i zamrznuti -20°C. Pre ekstrakcije semenke, pokožice i pulpa (meso) ručno su odvojeni iz bobica. Semenke i pokožice sušene su na 60°C i merene do konstantne mase. Osušene semenke i pokožice su samlevene u blender i kao takve korišćene za ekstrakcije.

Za analizu fizioloških svojstva grožđanih bobica uzimani su reprezentivni uzorci – 100 bobica, nasumično, sa svakog čokota. Deo uzoraka je iskorišćen za merenje mase bobica, a deo je iskorišćen za određivanje ostalih fizioloških svojstva. U tom cilju bobice su homogenizovane u blenderu a grožđani sok je odvojen od ostatka grožđane mase mehaničkim odvajanjem i filtriranjem.

U vreme berbe sakupljeni su i uzorci lišća sorti Vranac i Merlo i to zdravi listovi i inficirani plamenjačom vinove loze *Plasmopara Viticola*. Svi uzorci sušeni su na 60°C i samleveni u blender i kao takvi korišćeni za ekstrakcije. Takođe, sakupljeni su i uzorci komine nastale kao sporedni proizvod nakon vinifikacije pomenutih sorti grožđa. Ručno su odvojene semenke, pokožice i peteljke iz komine. Uzorci komine i posebno iz nje izdvojene semenke, pokožice i peteljke sušeni su na 60 °C, samleveni u blender i kao takvi korišćeni za ekstrakcije.

3.4.1. Konvencijalna ekstrakcija (KE)

Uzorci semenki (0,5 g), pokožice (0,5 g) i pulpe (1 g) ekstrahovani su rastvaračima: metanol, etanol, aceton, voda kao i njihovim smešama, konstantnim mešanjem na 200 RPM, na datoj temperaturi (20 - 50°C), na tamnom, za određeno vreme (10 - 120 min). Nakon toga ekstrakti su centrifugirani 10 min na 2500 × g i uparavani do suva pomoću rotacionog vakum uparivača. Dobijen čvrsti ostatak je rastvoren u u metanolu na koncentraciji od 0,1 g/mL.

3.4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UE)

Ekstrakcije su izvođene na ultrazvučnom kupatilu zapremine 3 L pod definisanim uslovima: frekvencija (20 – 40 kHz), ultrazvučna snaga (250 – 500 W), odnos tečno/čvrsto (40 - 60), temperatura (20 - 50°C) i vreme izvođenja ekstrakcije (1 – 40 min). Korišćeni su sledeći rastvarači: metanol, aceton, voda i sirćetna kiselina. Nakon tretmana, ekstrakti su centrifugirani 10 min na $2500 \times g$, a zatim uparavani do suva i čvrsti ostatak rastvoren u metanolu na koncentraciji od 0.1 g/mL. Svi ekstrakti su filtrirani pre analiza.

3.4.3. Ekstrakcija bio ulja iz semenki grožđa i komine

Za ekstrakciju ulja iz semenki grožđa i komine korišćen je heksan kao rastvarač. Ekstrakcija je izvođena pomoću Sokslet-ovog aparata uz refluks na temperaturi ključanja rastvarača (68,7°C). Vreme trajanja ekstrakcije je limitirano na 3 h. Dobijeni ekstrakt je uparavan pomoću vakuum-uparivača do suvog ostatka.

3.4.4. Transesterifikacija ulja semenki i komine

Proces transesterifikacije ulja od semenki grožđa i komine, izveden je u balonu sa okruglim dnom sa kondenzatorom uz refluks i korišćenjem magnetne mešalice. Primenjeni katalizatori za transesterifikaciju su na bazi CaO, pri čemu je prekursor bio tehnički CaO (tehničke čistoće, proizvođača Centrohem, Srbija). Heterogeni katalizatori kalcinirani su na temperaturama od 700 i 900 °C tokom 3 h. Svi katalizatori, sušeni su 3 h pre reakcije, i dodati predhodno pripremljenoj smeši ulja i metanola. Uslovi reakcije bili su: odnos ulje/methanol = 1 : 12 ili 1 : 15, temperatura refluksa, vreme reakcije 72 h, 10 mas. % udeo katalizatora (u odnosu na reakcionu smešu) i intenzitet mešanja od 550 rpm. Temperatura reakcija je održavana na 65°C pod refluksnim uslovima. Reakcija započinje kada se prva kapljica metanola vrati u balon sa okruglim dnom iz kondenzatora (nulto vreme reakcije transesterifikacije). Nakon završetka reakcije, metanol se odvaja iz reakcione smeše uparavanjem.

3.5. ANALIZA UZORAKA

3.5.1. Određivanje prinosa ekstrakcije

Prinos ekstrakcije Y , izražen u procentima, izračunat je preko suve mase uzorka i ekstrakta (m_S i m_E , respektivno) nakon odvajanja rastvarača na osnovu sledeće formule:

$$Y (\%) = (m_E / m_S) \times 100 \quad (1)$$

3.5.2. Određivanje fizioloških svojstva groždanih bobica

Određivanje fizioloških svojstva groždanih bobica izvršeno je standardnim metodama: ukupne rastvorljive čvrste materije iz groždanog soka ($^{\circ}$ Brix) primenom refraktometra; kiselost titracijom sa NaOH; pH vrednost pomoću kalibrisanog pH-metra i indeks zrelosti preko odnosa ukupne rastvorljive čvrste materije i kiselosti ($^{\circ}$ Brix/kiselost). $^{\circ}$ Brix je direktno povezan sa potencijalnom količinom alkohola, zap.% i sadržajem šećera, g/L (Fournand i sar., 2006).

3.5.3. Spektrometrijsko određivanje ukupnih fenola, hidrokscimetnih kiselina i flavonola

Ukupni fenolni sadržaj, kao i sadržaj hidrokscimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima određivan je primenom modifikovane Mazin-ove metode (Mazza i sar., 1999), 0.25 mL razblaženog ekstrakta pomeša se sa 0.25 mL 0.1% HCl u 95% etanolu i 4.55 mL 2% HCl. Absorbanca smeša očitava se nakon 15 min na UV/VIS spektrofotometru na talasnim dužinama od 280, 320 i 360 nm. Galna kiselina iskorišćena je za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje se određuje ukupni fenolni sadržaj ekstrakta očitavanjem absorbanci na 280 nm, izražen preko ekvivalenata galne kiseline (GAE). Sadržaj hidrokscimetnih kiselina dobijen je očitavanjem absorbanci na 320 nm, a kao standard korišćena je kafena kiselina. Rezultati su izraženi preko ekvivalenata kafene kiseline (CAE). Sadržaj flavonola procenjen je očitavanjem absorbanci na 360 nm, a kao standard je korišćen kvercetin. Rezultati su izraženi preko ekvivalenata kvercetina (QE).

3.5.4. Spektrometrijsko određivanje ukupnih antocijana

Ukupni sadržaj antocijana određen je prema Rig-ovoj metodi (Rigo i sar., 2000). Ispitivani ekstrakti razblaženi su rastvorom: etanol/voda/HCl (70/29/1) i nakon 15 min očitavana je absorbanca na talasnoj dužini od 540 nm. Malvidin-3-O-glukozid iskorišćen je kao standard a rezultati su izraženi preko ekvivalenta malvidin-3-O-glukozida (eng. malvidin-3-O-glucoside equivalents – ME).

3.5.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost određena je primenom 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil slobodnog radikala - DPPH• test (Choi i sar., 2002; Munoz-Espada i sar., 2004) koji se zasniva na merenju gubitka boje DPPH• radikala promenom absorbance na 515 nm uzrokovane reakcijom DPPH• radikalima sa ispitivanim ekstraktima. Absorbanca na 515 nm od razblaženog ekstrakta i sveže pripremljenog 1×10^{-4} M DPPH• metanolnog rastvora snima se nakon inkubacionog perioda od 20 min na sobnoj temperaturi. Antioksidativna aktivnost, odnosno kapacitet hvatanja slobodnih radikala (RSA, %) svakog ekstrakta određen je na osnovu sledeće formule:

$$\text{RSA, \%} = (1 - A_{\text{uzorak}} - A_{\text{blank}}/A_{\text{kontrola}}) \times 100 \quad (2)$$

Gde je A_{kontrola} absorbanca kontrolne reakcije (3×10^{-4} M DPPH• metanolnog rastvora), A_{blank} je absorbanca razblaženog ekstrakta i A_{uzorak} absorbanca smeše razblaženog ekstrakta i DPPH• metanolnog rastvora.

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) dalje je izračunata sa grafika konsturisanog nanošenjem različitih koncentracija ekstrakata (mL/g) na x-osi i njima odgovarajućih kapaciteta hvatanja slobodnih radikala (%) na y-osi i jednostavnim očitavanjem koncentracije ekstrakta koja odgovara kapacitetu hvatanja slobodnih radikala od 50%.

3.5.6. HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Fenolni sastav ekstrakata vinove loze analiziran je na HPLC uređaju povezanim sa UV-Vis i fluorescentnim detektorima. Pre analize ekstrakti su dodatno filtrirani kroz membranske filtere sa porama veličine 0.45 μm . Separacija je izvođena na koloni Agilent-Eclipse XDB C-18

4.6 × 150 mm. Kolona je kalibrirana na 30 °C. Korišćena je HPLC metoda (Radovanović i sar., 2010). Kao rastvarači su korišćeni: mravlja kiselina/voda (5:95 v/v) - rastvarač A, i acetonitril/mravlja kiselina/voda (80:5:15 v/v) - rastvarač B. Korišćen je linearni eluacioni gradijent po sledećem: od 0 do 10 min, 0.0% B, od 10 do 28 min, 10.0% B, od 28 do 35 min, 25% B, od 35 do 40 min, 50% B, od 40 do 45 min, 80% B, i poslednjih 10 min ponovo 0% B. Injekciona zapremina bila je 5 µL a protok mobilne faze bio je 0.9 mL/min. Za detekcione talasne dužine izabrane su 280, 320, 360 i 520 nm za DAD, i 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) za fluroscentnu detekciju. Različita fenolna jedinjenja su identifikovana upoređivanjem njihovih retencionih vremena i spektralnih karakteristika sa podacima originalnih standardnih komponenti, kao i sa podacima iz literature (Revilla i Ryan, 2000; Radovanović i Radovanović, 2010). Kvantifikacija je izvršena korišćenjem eksterne kalibracije sa čistim standardnim rastvorima fenolnih jedinjenja. Kalibracione krive (pet tačaka, n = 2) bile su linearne, sa koeficijentom determinacije $R^2 = 0.99$. Rezultati su izraženi kao mg/g suve mase ekstrakta.

3.5.7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.5.7.1. Mikrobiološki sojevi

Antimikrobna aktivnost uzoraka ispitivana je protiv patogenih bakterija iz grupe Gram (+) bakterija: *Clostridium perfringens* (ATCC 19404), *Bacillus cereus* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) i *Micrococcus flavus* (ATCC 40240), iz grupe Gram (-) bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Shiella sonnei* (ATCC 25931), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) i *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) i protiv jednog patogenog kvasca *Candida albicans* (ATCC 10231).

3.5.7.2. Mikrodiluciona metoda

Mikrodiluciona metoda (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2007) korišćena je za određivanje minimalne inhibicione koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ispitivanih uzoraka. Inokulumi patogenih sojeva uzeti su od

prekonoćnih kultura uzgajanih na odgovarajućim čvrstim podlogama (Muller-Hinton agar za bakterije i Saburodekstrozni agar za kvasce) i pripremljene su suspenzije standardne zamućenosti turbiditeta 0,5 McFarlanda. Serije duplih razblaženja testiranih uzoraka pripremane su u inokulisanim hranljivim bujonima 96 bunarića mikrotitarske ploče, u opsegu od 0,25-500 µg/mL. Konačna zapremina u svakom bunariću bila je 100 µL a konačna koncentracija mikrobnih ćelija bila je 10⁶ CFU/mL u svakom bunariću. Pločesu inkubirane 24 h na 37 °C. Svi eksperimenti izvedeni su u tri ponavljanja. Korišćene su i dve kontrole, negativna kontrola - odgovarajući hranljivi medijum sa metanolom i pozitivna kontrola - medijum sa antibioticima: hloramfenikolom, streptomycinom i tetraciklinom. Rast mikroorganizama određen je očitavanjem absorbance na 620 nm pomoću univerzalnog čitača mikroploča (ThermoLabsystems, Multiskan EX, softver za Multiscan ver.2.6.). MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) definisana je kao najmanja koncentracija testiranih ekstrakata na kojoj mikroorganizmi ne pokazuju vidljiv rast. U cilju određivanja MBC/MFC (minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije), uzet je bujon iz svakog bunarića bez vidljivog rasta, inokuliran na Muller Hinton agaru (bakterije) i Saburodekstroznom agaru (kvasci) i inkubiran 24 h na 37 °C. MBC je definisana kao najniža koncentracija testiranih ekstrakata na kojoj je 99.9 % inokuliranih mikroorganizama ubijeno.

3.5.8. GC-MS analiza bio ulja iz semenki grozda i komine

GC-MS analiza bio ulja iz semenki i komine izvršena je korišćenjem Hewlett-Packard 6890N gasnog hromatografa opremljenog sa sjedinjenom silica kapilarnom kolonom DB-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0.25 mm, debljine filma 0.25 mm, Agilent Technologies, USA) i povezana sa 5975B masenim selektivnim detektorom (Agilent Technologies, USA). Injektor i interfejs su podešeni za rad na operativnoj temperaturi od 250 °C i 300 °C, po redu javljanja.

3.5.9. NMR analiza biodizela iz ulja semenki grozda i komine

¹H NMR spektri reakcione smeše uzoraka snimljeni su na GEMINI-200 spektrometru koji radi na 200 MHz. Svi NMR spektri snimljeni su na 25 °C u CDCl₃ sa tetrametilsilanom (TMS) kao internim standardom. Hemijska pomeranja izražena su u ppm (δ) i standardizovana prema TMS.

Prinos bio dizela izračunat je primenom Knothe-ovoj jednačini (Knothe, 2000) na osnovu integracionih vrednosti pikova sa NMR spektra testiranog uzorka:

$$C_K = 100 \times \left(\frac{5 \times I_{ME}}{5 \times I_{ME} + 9 \times I_{AG}} \right) \quad (3)$$

Gde je I_{ME} integraciona vrednost pika protona iz nastale metilestarske grupe (δ 3.70) i I_{AG} integraciona vrednost pika protona glicerida (δ 4.10-4.40).

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti su ponavljani tri puta. Vrednosti su izražene kao srednje \pm standardna devijacija. Značajne razlike u podacima određene su korišćenjem analize varijansi (ANOVA), praćene Tukey-ovim testom. Podaci su analizirani korišćenjem softverskih paketa: Origin software package, version 7.0 i SPSS 20.0 software for Windows (IBM SPSS, USA).

3.6.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

SPSS 20.0 softver takođe je iskorišćen za analize glavnih komponenti analiziranih ekstrakata. Analiza glavnih komponenti (PCA) primenjuje se kada je veliki broj varijabli u skupu redundantan, odnosno kada se više varijabli odnosi na istu dimenziju i kada ne pružaju nikakvu dodatnu informaciju koja već nije obuhvaćena nekom drugom varijablom. Geometrijski gledano, to znači da na prostoru od k dimenzija imamo p varijabli pri čemu je $k < p$. Očekuje se da će k najvećih glavnih komponenti biti dovoljno da objasni varijabilitet podataka u skupu.

Cilj analize je da se uzme p varijabli (X_1, X_2, \dots, X_p) i da se pronade kombinacija istih da bi se izračunale nove varijable (Z_1, Z_2, \dots, Z_p) koje međusobno nisu u korelaciji i koje će opisivati varijacije podataka. Nepostojanje korelacije znači da nove varijable mere međusobno različite „dimenzije“ podataka i njihove varijanse poredane su u opadajući niz ($\text{Var}(Z_1) \geq \text{Var}(Z_2) \geq \dots \geq \text{Var}(Z_p)$). Promenljive Z predstavljaju zapravo glavne komponente. Kada se radi analiza glavnih komponenti, želja je da varijanse većine promenljivih Z budu toliko male da su zanemarljive. U tom slučaju, veći deo varijacija originalnih podataka može se adekvatno opisati sa svega nekoliko glavnih komponenti, čime se postiže određeni stepen uštede. Analiza glavnih komponenti ne uspeva uvek u tome da se veliki broj originalnih varijabli X smanji na mali broj

izvedenih varijabli Z . Ako originalne varijable nisu u korelaciji, analiza neće postići nikakav rezultat. Najbolji rezultati postižu se kada su originalne varijable u visokoj korelaciji, bilo pozitivnoj ili negativnoj. Ako postoji takav slučaj, onda se može očekivati da će se skup od 20 originalnih varijabli redukovati na svega dve ili tri glavne komponente. Pored toga, korisna će biti i činjenica da je otkriven visok stepen redundantnosti kod originalnih varijabli. Izvedena promenljiva Z predstavlja zapravo prosek standardizovanih vrednosti obeležja originalnih promenljivih i može se posmatrati kao indeks.

3.6.2. Metodologije odziva površine (RSM)

Optimizacija uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja vršena je pomoću Metodologije odziva površine (RSM) korišćenjem softvera Design Expert (verzija 7.1.6, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Statistički modeli i njihove grafičke slike su konstruisani korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna (eng. central composite design - CCD).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. OTIMIZACIJA USLOVA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE (KE) FENOLNIH JEDINJENJA

Pregledom literature koja se odnosi na utvrđivanje sastava i koncentracije bioaktivnih supstanci iz biljaka ili pojedinih biljnih delova (Baydar i sar., 2003; Yilmaz i Toledo, 2006; Downey i sar., 2007; Katalinic i sar., 2010; Xia i sar., 2010), često se dolazi do veoma različitih podataka kao posledica različitih interpretacija dobijenih rezultata (koncentracija ovih supstanci izražava se u odnosu na sveži ili suvi biljni materijal). Takođe dobijeni rezultati umnogome zavise od genotipa biljnog materijala, uticaja spoljne sredine, kao i od primenjene tehnike ekstrakcije i od uslova pod kojim se ekstrakcija biljnog materijala izvodi.

Zbog toga u ovom delu biće diskutovani rezultati dobijenih analiza praćenjem različitih parametara konvencionalne ekstrakcije primenom spektrofotometrijskih metoda datih u eksperimentalnom delu.

4.1.1. Uticaj rastvarača i njihovog odnosa na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane, hidroksicimetne kiseline i flavonole iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

Izbor rastvarača za izvođenje ekstrakcije može često da bude od presudnog značaja za dobijanje većeg sadržaja fenolnih jedinjenja (Alothman i sar., 2009). Najčešće su korišćeni metanol, etanol, aceton, etilacetat kao rastvarči za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala (Xia i sar., 2010). Biljni fenoli se veoma razlikuju po polarosti tako da se često organski rastvarči različite polarosti mešaju međusobno ili sa vodom u cilju ekstrakcije što šireg spektra fenolnih jedinjenja (Xia i sar., 2010). Takođe, ova jedinjenja razlikuju se po kiselosti pa je potrebno ovim sistemima za ekstrakciju obezbediti i odgovarajuću pH dodavanjem odgovarajućih kiselina (Fournand i sar., 2006).

U ovoj disertaciji ispitivana je podobnost ukupno 12 sistema rastvarača (tabela 4.1) za dobijanje ekstrakata iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac na prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina i flavonola a dobijeni rezultati spektrofotometrijskom analizom prikazani su u tabeli 4.2 i slikama 4.1-4.3.

Tabela 4.1: Pregled ispitivanih sistema rastvarača za ekstrahovanje fenolnih jedinjenja iz semenke, pokožice i pulpe bobica

Redni broj	Primenjeni sistem rastvarača za ekstrakciju
I	Etanol/voda/sirćetna kiselina (90/9,5/0,5)
II	Etanol/voda/sirćetna kiselina (50/49,5/0,5)
III	Etanol/voda/sirćetna kiselina (30/69,5/0,5)
IV	Metanol/voda/sirćetna kiselina (90/9,5/0,5)
V	Metanol/voda/sirćetna kiselina (50/49,5/0,5)
VI	Metanol/voda/sirćetna kiselina (30/69,5/0,5)
VII	Aceton/voda/ sirćetna kiselina (90/9,5/0,5)
VIII	Aceton/voda/ sirćetna kiselina (50/49,5/0,5)
IX	Aceton/voda/ sirćetna kiselina (30/69,5/0,5)
X	Metanol/aceton/voda/sirćetna kiselina (50/40/9,5/0,5)
XI	Metanol/aceton/voda/sirćetna kiselina (40/40/19,5/0,5)
XII	Metanol/aceton/voda/sirćetna kiselina (30/42/27,5/0,5)

Od dvofaznih sistema rastvarača prinos ekstrakcije bio je najveći kod sistema aceton/voda i to za 2,8% od prinosa ekstrakcije upotrebom sistema rastvarača metanol/voda i za 8,1% od prinosa ekstrakcije upotrebom sistema etanol/voda (slika 4.1).

Pored dvofaznih sistema za ekstrakciju ispitivani su i trofazni sistemi, kao što je sistem rastvarača metanol/aceton/voda/sirćetna kiselina u različitom međusobnom odnosu. Upotrebom ovog sistema rastvarača dobijen je najveći prinos ekstrakta i to za 7% veći nego upotrebom dvofaznog sistema aceton/voda (slika 4.1).

Rezultati pokazuju da fenolni sastav dobijenih ekstrakata značajno zavisi kako od izbora rastvarača tako i od njihovog međusobnog odnosa u smeši koja se upotrebljava za ekstrakciju. Najveći sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina i flavonola pokazali su ekstrakti dobijeni upotrebom sistema rastvarača: metanol/aceton/voda/sirćetna kiselina u međusobnom procentnom odnosu: 30/42/27,5/0,5, dok je povećanjem procentnog udela metanola u istom sistemu rastvarača njihov sadržaj bio manji (slike 4.2-4.4).

Kod dvofaznih sistema najveći sadržaj fenola bio je kod acetonsko-vodenih ekstrakata, a najmanji kod etanolsko-vodenih ekstrakata, u proseku za 9% (slika 4.2).

Sadržaj antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina povećavao se upotrebom sledećih sistema rastvarača: etanol/voda/sirćetna kiselina < metanol/voda/sirćetna kiselina < aceton/voda/sirćetna kiselina (slike 4.3 i 4.4). Ovakva selektivna ekstrakcija fenolnih jedinjenja može se objasniti činjenicom da je u grožđu prisutan veliki broj različitih fenolnih jedinjenja koja se veoma razlikuju po svojoj kiselosti i polarnosti.

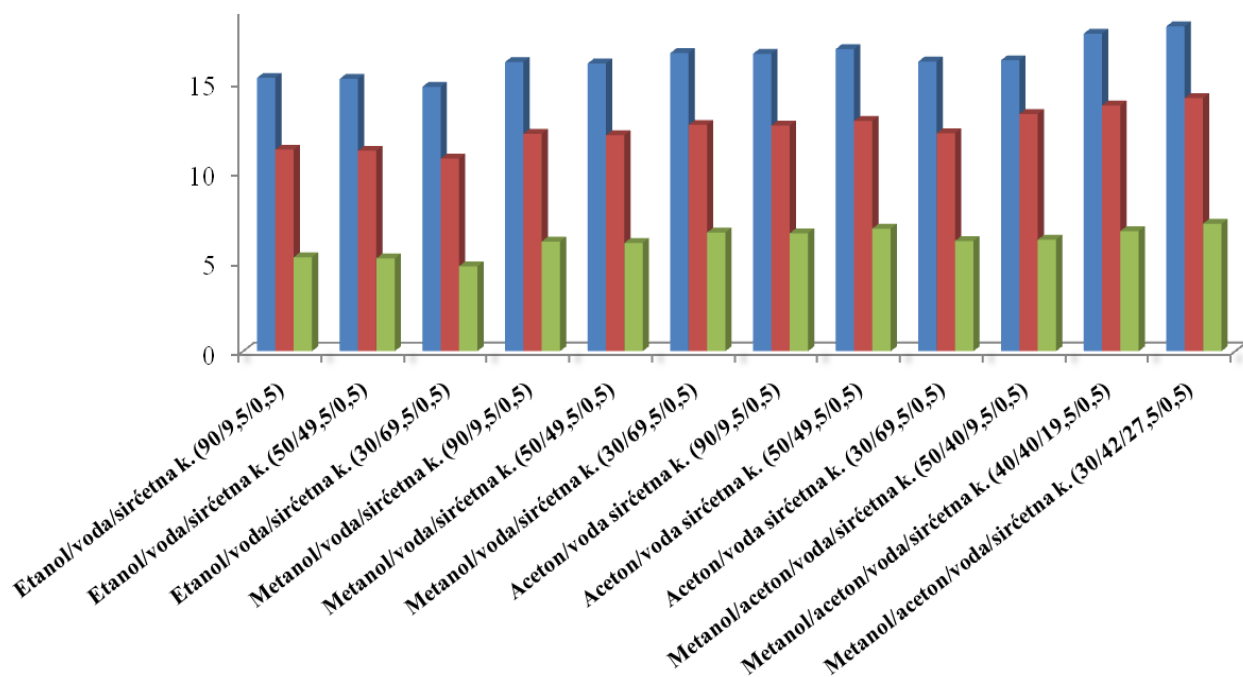
Prisustvo vode povećava polarnost ekstrakcionog sredstva (dielektrična konstanta vode je 78,3 dok je metanola 37,9; etanola 25,2 i acetona 20,7) i utiče na bubrenje biljnog materijala, što povećava kontaktnu površinu između biljnog matriksa i rastvarača (Hemwimon i sar., 2007). Međutim, eksperimentalni rezultati su pokazali da se najveći prinos fenolnih jedinjenja dobija upotrebom sistema rastvarača sa manjim procentnim sadržajem vode (slike 4.2-4.4). Ovo se može objasniti da pored polarnosti rastvarača treba uzeti u obzir i druge njihove osobine kao što su viskoznost i površinski napon. Povećanje viskoznosti proporcionalno smanjuje koeficijent difuzije, dok se smanjenje površinskog napona povoljno odražava na brzinu ekstrakcije. Ove karakteristike su znatno povoljnije kod organskih rastvarača nego kod vode. Najmanji viskozitet ima aceton, pa zatim slede metanol, voda i etanol (0,32; 0,6; 1 i 1,2 mPa s, respektivno). Površinski napon je za više od 60% manji kod organskih rastvarača (etanol - 22,03; metanol - 22,99 i aceton - $23,70 \times 10^3$ N/m) nego kod vode ($72,5 \times 10^3$ N/m). Ovakve vrednosti viskoziteta i površinskog napona imale su veliki uticaj na dobijanje visokog prinosa svih ispitivanih klasa fenolnih jedinjenja kod acetonsko-vodenih ekstrakata, što je u saglasnosti sa rezultatima ekstrakcije biljnog materijala drugih autora (Chirinos i sar., 2007; Alothman i sar., 2009). Vodeni rastvor acetona dobar je rastvarač za ekstrakciju polarnih jedinjenja kao što su polifenoli iz proteinskih matriksa, jer razgrađuje polifenol-proteinske matrikse. Sa druge strane, metanol je efikasniji za ekstrakciju polifenola iz polarnih, vlaknastih matriksa (Chirinos i sar., 2007; Al Farsi i Lee, 2008).

Tabela 4.2: Prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina ekstrahata semenke, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac u zavisnosti od primenjenog sistema rastvarača i odnosa pojedinih rastvarača u tom sistemu

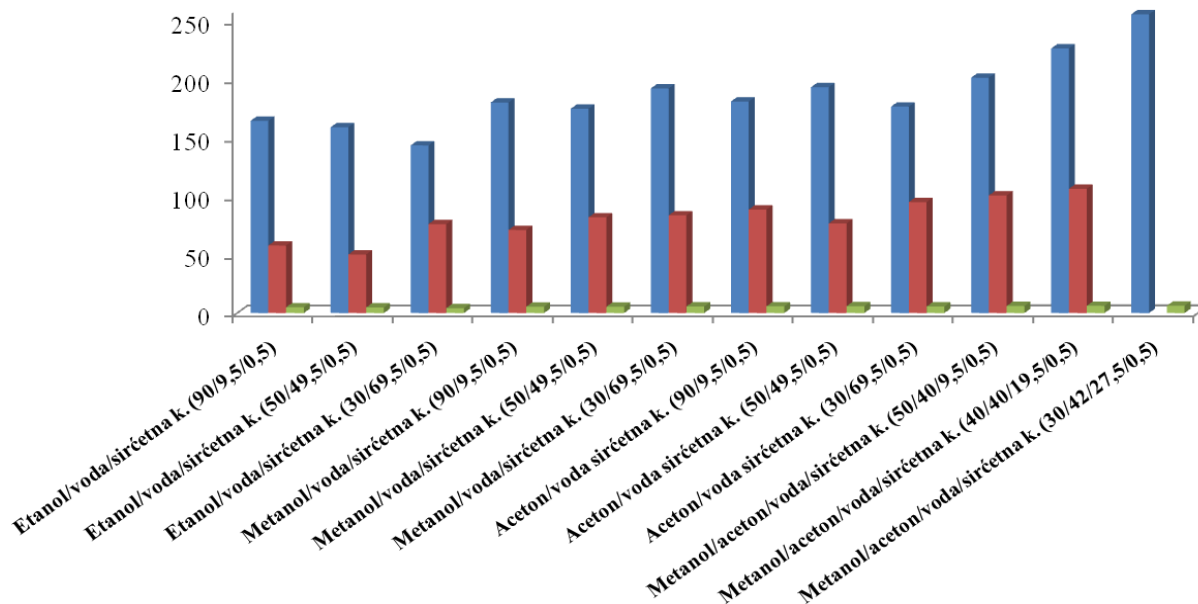
Sistem rastvarača	Biljni materijal	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Ukupni antocijani (mg ME/g)	Ukupni flavonoli (mg QE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/g)
I	semenka	15,23±0,10	164,92±2,10	-	-	-
	pokožica	11,12±0,09	59,26±1,10	7,04±0,14	0,85±0,01	3,89±0,09
	pulpa	5,34±0,07	4,93±0,12	-	-	0,89±0,01
II	semenka	15,17±0,10	159,41±2,20	-	-	-
	pokožica	11,06±0,08	57,91±1,12	6,92±0,12	0,81±0,01	3,80±0,10
	pulpa	5,28±0,04	4,77±0,09	-	-	0,84±0,03
III	semenka	14,73±0,12	143,82±1,81	-	-	-
	pokožica	10,62±0,10	50,26±1,11	6,08±0,09	0,73±0,02	3,66±0,10
	pulpa	4,84±0,04	4,15±0,08	-	-	0,76±0,04
IV	semenka	16,11±0,11	180,69±2,11	-	-	-
	pokožica	12,00±0,10	76,33±1,17	9,70±0,21	0,95±0,05	4,07±0,13
	pulpa	6,22±0,09	5,47±0,11	-	-	0,93±0,10
V	semenka	16,03±0,13	175,34±2,1	-	-	-
	pokožica	11,92±0,11	71,27±1,66	9,35±0,18	0,89±0,02	3,96±0,10
	pulpa	6,14±0,05	5,39±0,20	-	-	0,88±0,03
VI	semenka	16,61±0,10	192,78±2,3	-	-	-
	pokožica	12,50±0,10	82,14±1,32	9,89±0,19	0,94±0,03	4,13±0,12
	pulpa	6,72±0,04	5,63±0,09	-	-	0,97±0,02
VII	semenka	16,57±0,13	181,52±2,23	-	-	-
	pokožica	12,46±0,11	83,81±1,79	12,68±0,26	0,91±0,04	4,89±0,11
	pulpa	6,68±0,06	5,76±0,20	-	-	0,95±0,04
VIII	semenka	16,83±0,14	193,77±2,26	-	-	-
	pokožica	12,72±0,45	88,77±1,20	12,94±0,18	1,11±0,10	4,95±0,20
	pulpa	6,94±0,16	5,84±0,18	-	-	1,07±0,09
IX	semenka	16,14±0,22	177,13±2,27	-	-	-
	pokožica	12,03±0,21	76,91±1,09	11,73±0,14	1,01±0,09	4,7±0,23
	pulpa	6,25±0,14	5,59±0,17	-	-	1,03±0,08

Sistem rastvarača	Biljni materijal	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Ukupni antocijani (mg ME/g)	Ukupni flavonoli (mg QE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/g)
X	semenka	16,21±0,19	201,93±3,10	-	-	-
	pokožica	13,10±0,14	95,23±1,11	17,05±0,22	1,21±0,08	6,48±0,18
	pulpa	6,32±0,10	6,03±0,23	-	-	1,15±0,10
XI	semenka	17,69±0,16	227,05±3,47	-	-	-
	pokožica	13,58±0,22	100,95±2,15	18,74±0,24	1,29±0,17	6,89±0,24
	pulpa	6,80±0,11	6,16±0,16	-	-	1,23±0,10
XII	semenka	18,10±0,31	256,34±3,81	-	-	-
	pokožica	13,99±0,24	106,62±2,13	19,23±0,19	1,41±0,23	7,19±0,23
	pulpa	7,21±0,14	6,24±0,22	-	-	1,33±0,09

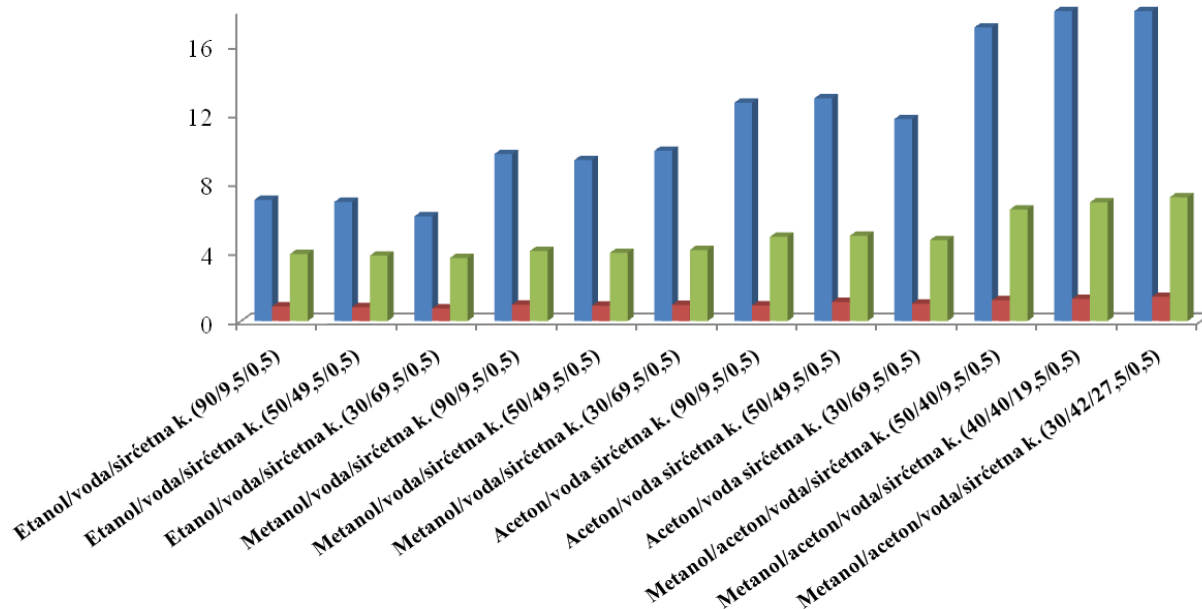
Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.1: Prinos ekstrakcije (%) iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih sistema rastvarača i odnosa pojedinih rastvarača u tom sistemu



Slika 4.2: Ukupni fenoli (mg GAE/g) iz ekstrakata ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih sistema rastvarača i odnosa pojedinih rastvarača u tom sistemu



Slika 4.3: Sadržaj ■ ukupnih antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ■ hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) iz ekstrakata pokožice bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih sistema rastvarača i odnosa pojedinih rastvarača u tom sistemu

4.1.2. Uticaj odnosa rastvarač-biljni materijal na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane flavonole i hidroksicimetne kiseline iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

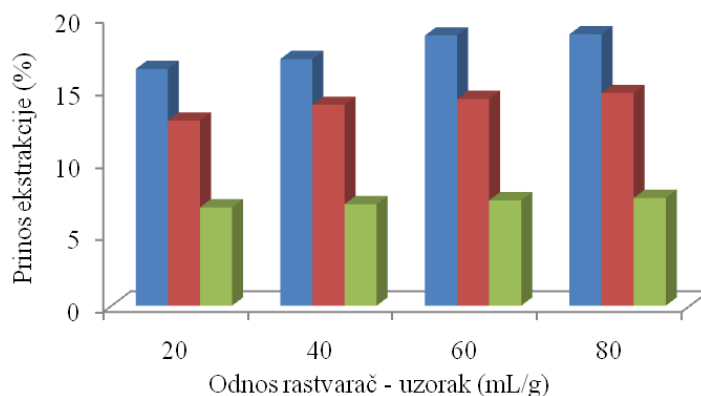
Odnos rastvarač-uzorak u znatno manjoj meri utiče na prinos ekstrakcije i sadržaj fenolnih jedinjenja (tabela 4.3 i slike 4.4-4.8) nego što je to slučaj sa izborom rastvarača. Međutim ovo je takođe važan parametar pre svega sa ekonomske tačke gledišta, tj. kada je cilj dobijanje ekstrakata visokog sadržaja ciljnih jedinjenja sa što manjom količinom upotrebljenih rastvarača i biljnog materijala.

Generalno, može se zaključiti da sa povećanjem odnosa rastvarač-biljni material raste prinos ekstrahovanih materija tj. ukupnih fenola, atocijanina, flavonola i hidroksicimetnih kiselina. Prinos ekstrahovanih materija je u proseku veći za 13% upotrebom odnosa rastvarača i biljne materije 80 mL/g u poređenju sa prinosom kada je njihov odnos 20 mL/g (slika 4.5). Kako je razlika između odnosa rastvarača i biljne materije 60 i 80 mL/g neznatna (ispod 1%), uzimajući u obzir ekonomsku stranu, korišćen je odnos rastvarača i biljne materije od 60 mL/g kao optimalni za dalja ispitivanja.

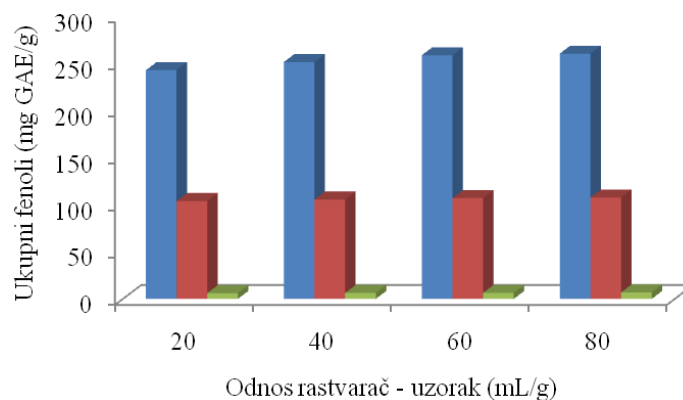
Tabela 4.3: Prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicinaminskih kiselina i flavonola iz ekstrakata semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih odnosa rastvarač-uzorak

Odnos rastvarač - biljni materijal (mL/g)	Biljni materijal	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Ukupni antocijani (mg ME/g)	Ukupni flavonoli (mg QE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mgCAE/g)
20	semenka	16,42±0,27	243,15±3,43	-	-	-
	pokožica	12,84±0,18	104,11±1,78	16,85±0,27	1,31±0,11	6,78±0,16
	pulpa	6,82±0,11	6,07±0,19	-	-	1,17±0,09
40	semenka	17,11±0,22	251,83±3,68	-	-	-
	pokožica	13,93±0,10	105,74±2,11	17,72±0,18	1,37±0,15	7,09±0,15
	pulpa	7,04±0,10	6,25±0,20	-	-	1,28±0,10
60	semenka	18,74±0,28	259,11±3,33	-	-	-
	pokožica	14,34±0,20	107,14±1,34	19,21±0,16	1,46±0,21	7,22±0,24
	pulpa	7,31±0,15	6,42±0,36	-	-	1,36±0,13
80	semenka	18,83±0,26	260,80±2,95	-	-	-
	pokožica	14,75±0,18	107,91±1,92	19,83±0,21	1,50±0,09	7,41±0,31
	pulpa	7,47±0,12	6,91±0,23	-	-	1,37±0,09

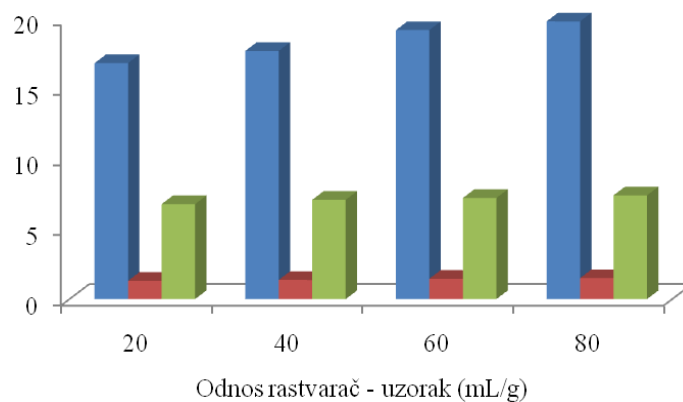
Rezultati si izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.4: Prinos ekstrakcije iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih odnosa rastvarač – uzorak



Slika 4.5: Ukupni fenoli iz ekstrakata ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih odnosa rastvarač – uzorak



Slika 4.6: Sadržaj ■ ukupnih antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ■ hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) iz ekstrakata pokožice bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih odnosa rastvarač – uzorak

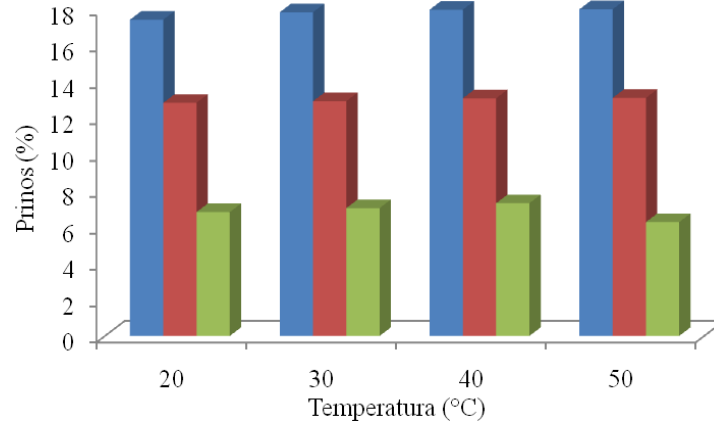
4.1.3. Uticaj temperature ekstrakcija na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, antocijane, flavonole, hidroksicimetne kiseline i flavanole iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

Uticaj temperature na ekstrakciju fenolnih jedinjenja ispitivan je u temperaturnom intervalu od 20 do 50 °C na pet različitih temperatura: 20, 30, 40 i 50 °C. Temperature iznad 50 °C nisu ispitivane zbog isparljivosti primenjenih rastvarača na višim temperaturama i degradacionih procesa fenolnih jedinjenja. Rezultati ispitivanja uticaja temperature na ekstrakciju dati su u tabeli 4.4 i prikazani na slikama 4.7-4.9.

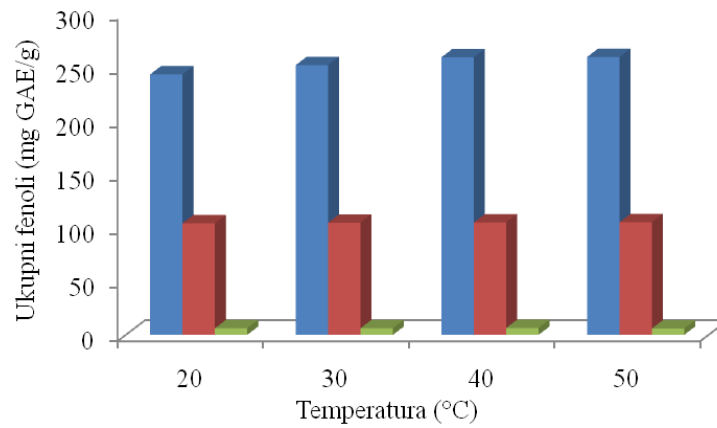
Tabela 4.4: Prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstraktata semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različite temperature

Temperatura (°C)	Biljni materijal	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Ukupni antocijani (mg ME/g)	Ukupni flavonoli (mg QE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mgCAE/g)
20	semenka	17,42±0,23	243,15±3,45	-	-	-
	pokožica	12,84±0,14	104,11±2,15	16,85±0,25	1,39±0,10	6,78±0,30
	pulpa	6,82±0,11	6,07±0,18	-	-	1,17±0,14
30	semenka	17,83±0,22	251,83±3,74	-	-	-
	pokožica	12,93±0,12	104,74±1,77	16,95±0,19	1,44±0,09	7,09±0,18
	pulpa	7,04±0,12	6,25±0,20	-	-	1,28±0,11
40	semenka	17,97±0,19	259,11±4,02	-	-	-
	pokožica	13,09±0,14	104,99±1,68	17,21±0,20	1,71±0,21	7,22±0,23
	pulpa	7,31±0,10	6,42±0,18	-	-	1,36±0,10
50	semenka	17,99±0,14	259,41±3,94	-	-	-
	pokožica	13,11±0,10	105,1±1,25	17,18±0,18	1,72±0,19	7,41±0,34
	pulpa	6,27±0,09	5,91±0,17	-	-	1,17±0,10

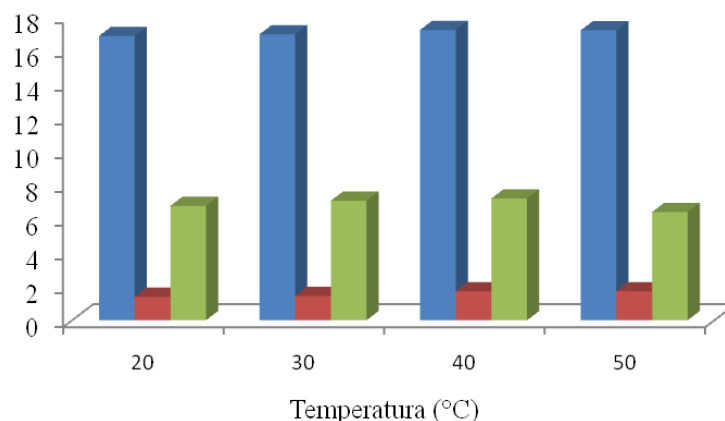
Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.7: Prinos ekstrakcije ekstrakata ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih ekstrakcionih temperatura



Slika 4.8: Ukupni fenoli iz ekstrakata ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih ekstrakcionih temperatura



Slika 4.9: Sadržaj ■ ukupnih antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ■ hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) iz ekstrakata pokožice bobica sorte Vranac dobijenih primenom različitih ekstrakcionih temperatura

Rezultati (tabela 4.4 i slikama 4.7-4.12) pokazuju da postoji blago povećanje prinosa ekstrakcije kao i sadržaja fenola, antocijana, hidroksicinaminskih kiselina i flavonola u svim ekstraktima sa povećanjem temperature. Povećanjem temperature od 20 °C na 50 °C prinos ekstrakcije se povećao u proseku za 3 do 3,5%, sadržaj ukupnih fenola od 6,5 do 7%, antocijana oko 2%, flavonola oko 19% i hidroksicinaminskih kiselina oko 8,5%.

Sa povećanjem temperature smanjuje se viskoznost rastvarača, povećava koeficijent difuzije bioaktivnih materija kroz rastvarač, skraćuje vreme bubrenja i prodiranja rastvarača u ćelije biljnog materijala, što sve pozitivno utiče na process ekstrakcije (Ponomarev, 1976). Daljim povećanjem temperature može doći do pada koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja u ekstraktu kao posledica oksidacionih i polimerizacionih procesa koji otpočinju na povišenim temperaturama. Kako povećanjem temperature od 40 na 50 °C ne dolazi do značajnijeg povećanja u prinosu fenolnih jedinjenja, a i zbog smanjenja dodatnog unosa energije izabrana je temperatura ekstrakcije na 40 °C za optimalnu.

4.1.4. Kinetika konvencionalne ekstrakcije fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

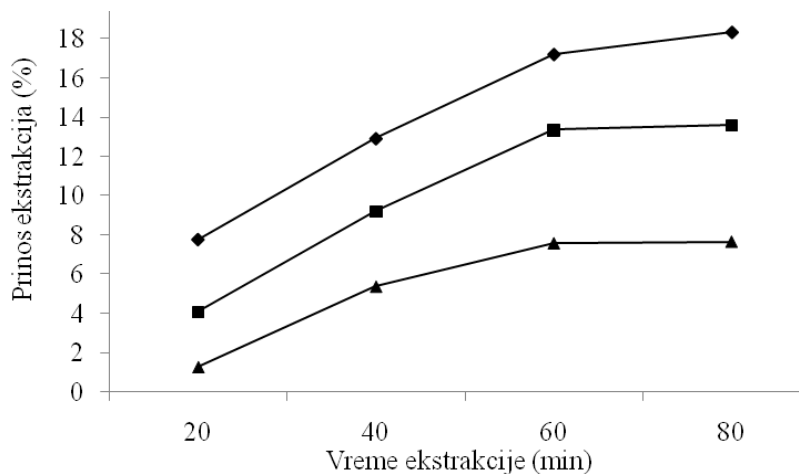
Vreme trajanja ekstrakcije takođe je bitan parametar od koga zavisi prinos i koncentracija ekstrahovanih fenolnih jedinjenja. Produženom ekstrakcijom može doći do degradacije fenolnih komponenata, zbog toga su za praćenje prinosa ekstrakcije i fenolnog sadržaja prikazani rezultati ekstrakcija u trajanju od 20 do 80 minuta (tabela 4.5 i slike 4.10, 4.13 i 4.14).

Kod svih ekstrakata primećuje se znatno povećanje prinosa ekstrakcije sa povećanjem vremena ekstrahovanja do 60 minuta. I to: prinos ekstrakcije je 39% veći sa povećanjem vremena trajanja ekstrakcije od 20 na 40 min i za još 25% ako se vreme ekstrakcije produži na 60 min. Sa daljim povećanjem vremena trajanja ekstrakcije (sa 60 na 80 min) dolazi do neznatnog povećanja prinosa (u proseku za 2%).

Tabela 4.5: Prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac dobijenih pri različitoj dužini trajanja ekstrakcije

Vreme (min)	Biljni materijal	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (mg EGK/g)	Ukupni antocijani (mg ME/g)	Ukupni flavonoli (mg QE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mgCAE/g)
20	Semenka	7,78±0,32	159,36±2,47	-	-	-
	pokožica	4,09±0,17	65,17±1,88	7,22±0,19	0,81±0,09	1,47±0,10
	pulpa	1,27±0,12	2,39±0,10	-	-	1,31±0,12
40	semenka	12,92±0,22	170,89±2,72	-	-	-
	pokožica	9,21±0,18	85,29±1,98	13,4±0,14	1,29±0,10	3,56±0,18
	pulpa	5,38±0,13	4,41±0,10	-	-	1,45±0,10
60	semenka	17,21±0,19	207,23±3,09	-	-	-
	pokožica	13,36±0,5	105,62±2,27	17,49±0,14	1,96±0,10	6,89±0,22
	pulpa	7,59±0,10	6,59±0,18	-	-	1,59±0,10
80	semenka	18,34±0,27	260,78±4,20	-	-	-
	pokožica	13,61±0,18	105,91±2,04	17,59±0,18	2,07±0,12	6,97±0,19
	pulpa	7,67±0,10	6,68±0,19	-	-	1,73±0,13

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.10: Prinos ekstrakcije iz ◆ semenki, ■ pokožice i ▲ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih pri različitoj dužini trajanja ekstrakcije

Za kinetička ispitivanja praćen je prinos ekstrakcije iz semenki, pokožice i pulpe bobica u vremenskom intervalu od 10 do 120 minuta (slike 4.11 i 4.12). Modelovanje kinetike ekstrakcije izvršeno je primenom dva modela: I – model zasnovan na empirijsku jednačinu Ponomarjev-a i II – model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni material (Ponomarjev, 1976).

Model I predstavlja matematički opis promene količine ekstraktivnih materija u biljnoj sirovini bez fizičke osnove (jednačina 4).

$$\frac{q_0 - q_i}{q_0} = b + k \cdot t \quad (4)$$

gde je : q_0 – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini na početku,

q_i – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije - t ,

b – koeficijent ispiranja i

k – koeficijent spore ekstrakcije (koeficijent pravca linearne zavisnosti).

Model I ukazuje da u periodu spore ekstrakcije postoji linearna zavisnost između normalizovane mase ekstraktivnih materija $\frac{q_0 - q_i}{q_0}$ i vremena t .

Koeficijent ispiranja (b) je mera mase ekstraktivnih materija koja se rastvori pošto se biljna sirovina potopi u rastvarač.

Koeficijent k je brzina rastvaranja ekstraktivnih materija u odnosu na njihovu početnu masu u toku spore ekstrakcije i smatra se specifičnom brzinom spore ekstrakcije.

Model II je fizički model zasnovan na difuziji ekstraktivnih materija kroz rastvor i može se opisati Fikovim zakonima.

Promena sadržaja ekstraktivnih materija opisuje se pojednostavljenom dvoparametrskom jednačinom (jednačina 5) i njenim linearizovanim oblikom (jednačina 6):

$$\frac{q_i}{q_0} = (1 + b') \cdot e^{-k' \cdot t} \quad (5)$$

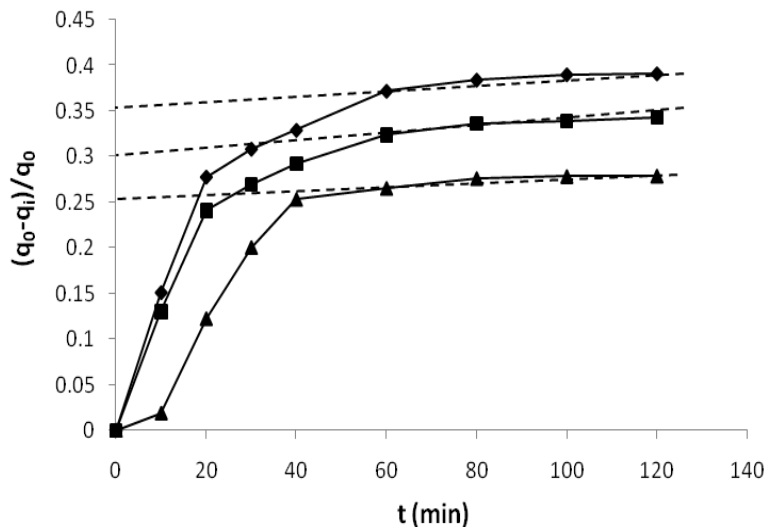
$$\ln \frac{q_i}{q_0} = \ln(1 + b') - k' \cdot t \quad (6)$$

gde je: q_0 – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini na početku,

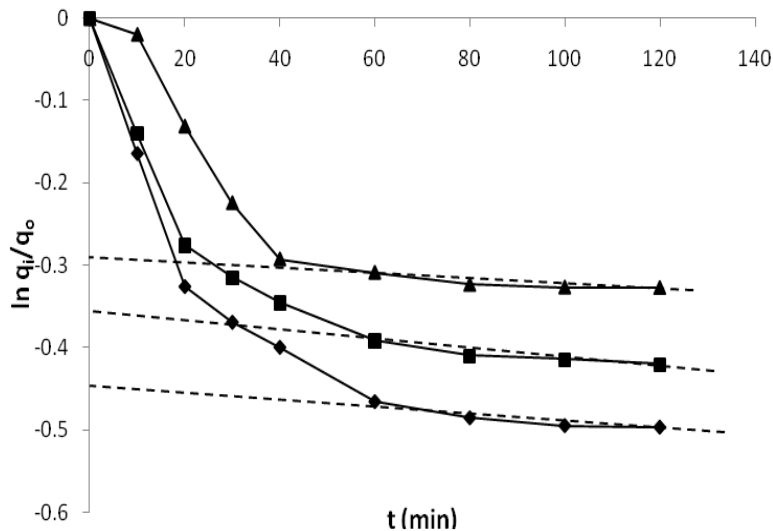
q_i – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije - t ,

b' – koeficijent ispiranja i

k' – koeficijent spore ekstrakcije.



Slika 4.11: Zavisnost: $(q_0 - q_i)/q_0$ od vremena ekstrakcije
(♦ semenke, ■ pokožica i ▲ pulpa bobica sorte Vranac)



Slika 4.12: Zavisnost : $\ln q_i/q_0$ od vremena ekstrakcije
 (♦ semenke, ■ pokožica i ▲ pulpa bobica sorte Vranac)

Na slici 4.11 je prikazana zavisnost $(q_0 - q_i)/q_0$ od vremena ekstrakcije semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac odakle se vidi da postoji linearna zavisnost u oblasti spore ekstrakcije.

Na slici 4.12 je prikazana zavisnost $\ln q_i/q_0$ od vremena ekstrakcije semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac, gde se takođe uočava linerna zavisnost u oblasti spore ekstrakcije. Vrednosti koeficijenata ispiranja i spore ekstrakcije izračunate su metodom najmanjih kvadrata, uzimajući u obzir samo tačke u oblasti spore ekstrakcije (tabela 4.6).

Tabela 4.6: Period brze ekstrakcije (PBE), stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijenata b , k , b' i k' u jednačinama kinetike ekstrakcije (modeli I i II)

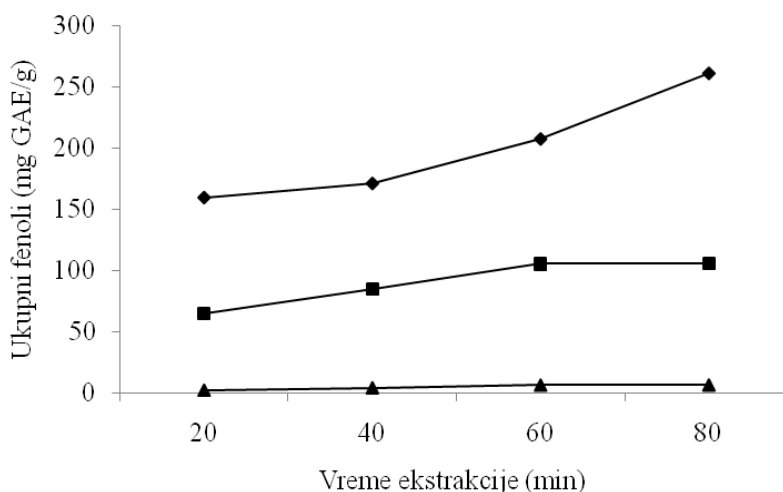
Biljni materijal	Model I			Model II		
	PBE, min	SE, %	b	$k \cdot 10^4, \text{min}^{-1}$	b'	$k' \cdot 10^4, \text{min}^{-1}$
Semenka	60	38	0,356	3,16	0,439	5,11
Pokožica	60	33	0,308	3,04	0,367	4,56
Pulpa	40	27	0,256	2,14	0,295	2,94

U tabeli 4.6 su date vrednosti perioda brze ekstrakcije (PBE) i stepena ekstrakcije (SE) koji se ekstraplacijom očitavaju sa grafika (slike 4.11 i 4.12). Period brze ekstrakcije je kod

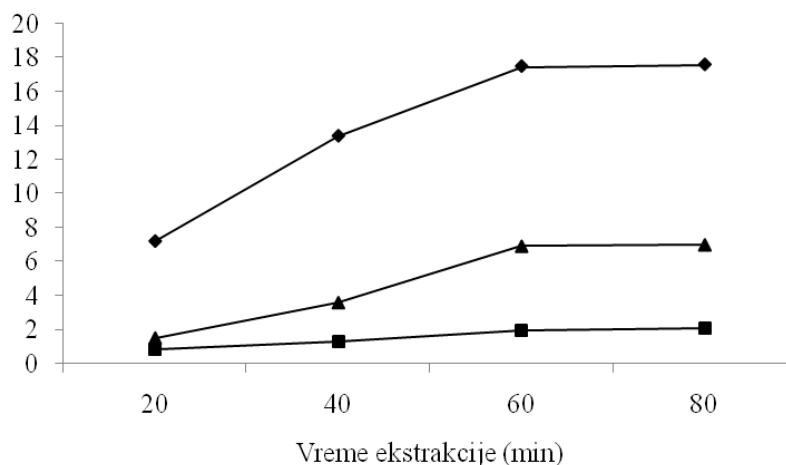
pulpe kraći (40 min) u odnosu na ekstrakcije iz semenki i pokožice (60 min) što se može objasniti činjenicom da rastvarač lakše prodire u sveži biljni materijal, kakava je pulpa grožđa i lakše rastvara fenolna jedinjenja u poređenju sa ekstrakcijom iz semenke i pokožice i to za 27 do 38% .

Koeficijenti b i k u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu I imaju niže vrednosti od koeficijenata b' i k' u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu II. Koeficijent brze ekstrakcije je kod modela I manji u proseku za 15%, a koeficijent spore ekstrakcije za 33% u odnosu na koeficijente u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu II. Analizom dobijenih rezultata se vidi da oba primenjena kinetička modela mogu biti korišćena za modelovanje procesa ekstrakcije iz semenke, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac.

Na slikama 4.13 i 4.14 prikazane su promene u sadržaju ukupnih fenola, antocijana, hidroksicinaminskih kiselina i flavonola.



Slika 4.13: Ukupni fenoli iz ekstrakata ♦ semenki, ■ pokožice i ▲ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih pri različitoj dužini trajanja ekstrakcije



Slika 4.14: Sadržaj ◆ ukupnih antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ▲ hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) iz ekstrakata semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac dobijenih pri različitoj dužini trajanja ekstrakcije

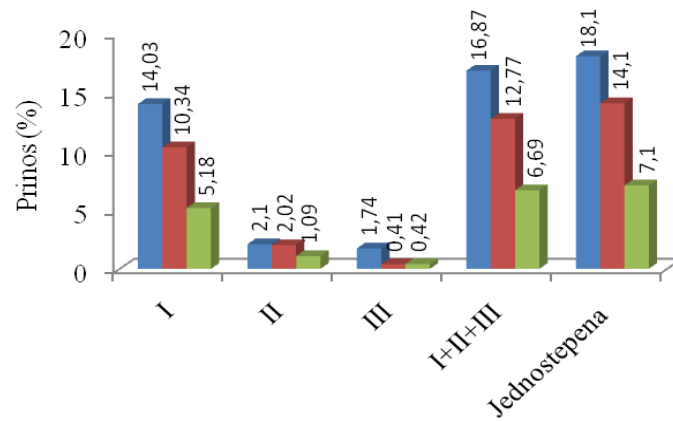
Podaci (slike 4.11 i 4.12 i tabela 4.6) ukazuju da se sadržaj ispitivanih grupa fenolnih jedinjenja povećava sa povećanjem vremena ekstrakovanja do 60 minuta. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno opisanim procesima spore i brze ekstrakcije.

4.1.5. Uticaj broja stepena ekstrakcije na prinos ekstraktivnih materija, ukupne fenole, antocijane flavonole i hidroksicimetne kiseline iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

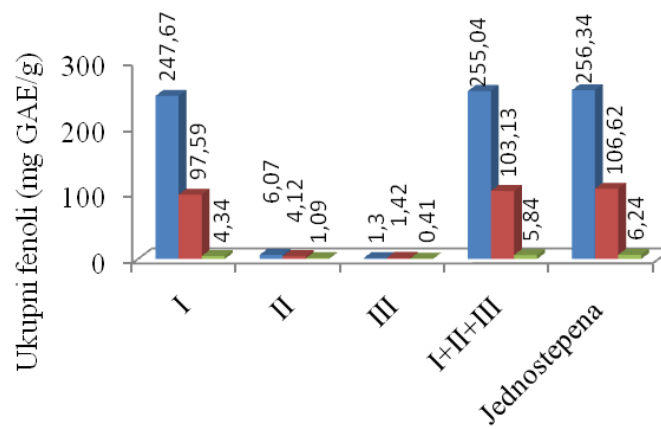
U cilju utvrđivanja optimalnih uslova ekstrakcije ispitivan je i uticaj broja (stepena) ekstrakcije. Ekstrakcija može biti jednostepena ili višestepena ekstrakcija (Mane i sar., 2007)

Za razliku od jednostepene ekstrakcije gde se nakon određenog vremena ekstrakt odvaja filtriranjem od biljne mase i dalje se koristi za analize, kod višestepene ekstrakcije biljna masa odvojena filtriranjem i dalje se podvrgava ekstrakciji sa istom smešom rastvarača. Nakon filtriranja svi dobijeni ekstrakti se sakupljaju i analiziraju.

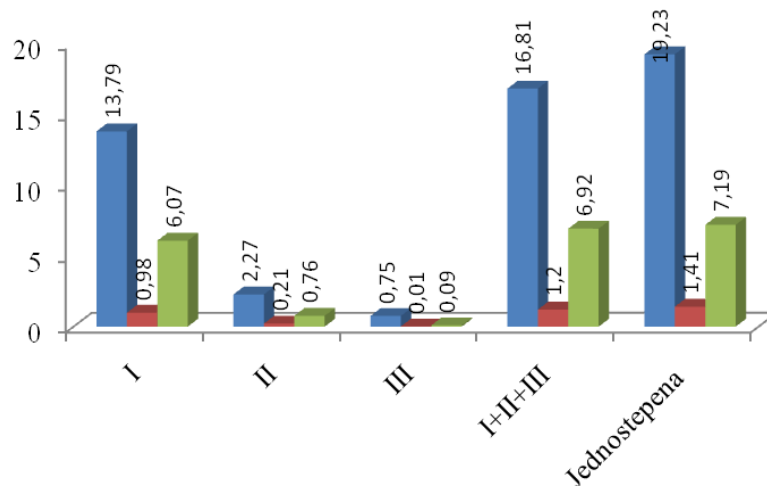
Naši uzorci groždja ekstrahovani su jednostepenom ekstrakcijom po proceduri opisanoj u eksperimentalnom delu za vreme od 90 min i po istoj proceduri trostepenom ekstrakcijom gde je svaki stepen trajao 30 min. Dobijeni rezultati prikazani su na slikama: 4.15-4.17.



Slika 4.15: Prinos ekstrakcije iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih jednostepenom i višestepenom ekstrakcijom



Slika 4.16: Ukupni fenoli iz ekstrakata ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac dobijenih pri jednostepenom i višestepenom ekstrahovanju



Slika 4.17: Sadržaj ■ ukupnih antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ■ hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) iz ekstrakata pokožice bobica sorte Vranac dobijenih pri jednostepenom i višestepenom ekstrahovanju

Dobijeni rezultati pokazuju da nema značajnije razlike u prinosu ekstrakcije, kao i u sadržaju fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim jednostepenom i višestepenom ekstrakcijom. Najveći prinos se dobija u prvom stepenu, znatno manje u drugom (u proseku za 85%) i trećem stepenu (u proseku za 88%).

Mane i sar. (2007) su došli do sličnih rezultata za jednostepenu i višestepenu ekstrakciju fenolnih supstanci iz grožđa sorte Pinot Noir. Zbog jednostavnosti izvođenja jednostepena ekstrakcija izabrana je za dalja ispitivanja, a na ovaj način se smanjuje i količina utrošenih rastvarača za ekstrakciju.

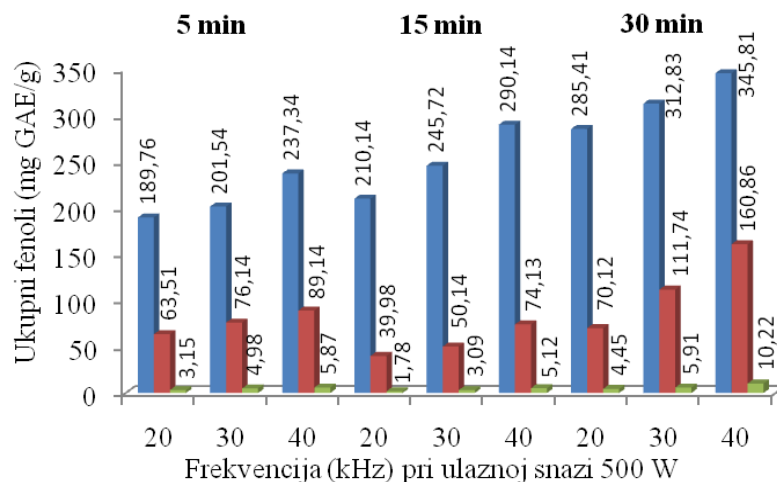
4.2. OTIMIZACIJA USLOVA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE (UE) FENOLNIH JEDINJENJA

Pored klasičnog načina ekstrakcije u posljednje vreme razvijaju se i druge ekstrakcione tehnike sa ciljem da se maksimiziraju ciljni produkti ekstrakcije, istovremeno da se smanje troškovi ekstrakcije kroz smanjenje korišćenja rastvarača, vremena trajanja ekstrakcije i drugo.

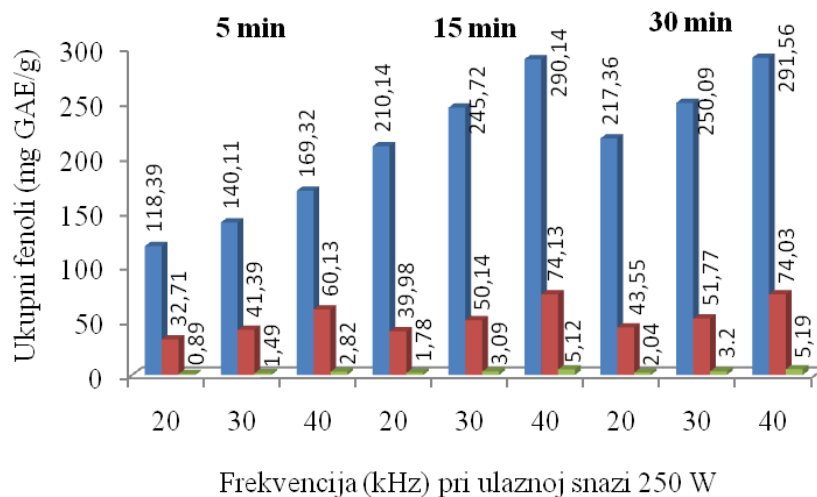
Neke od tih ekstrakcionih metoda zasnivaju se na primenu ultrazvuka, mikro talasa, superkritičnih fluida i dr. U ovoj disertaciji ispitivani su uslovi ekstrakcije uzoraka grožđa primenom ultra zvuka.

4.2.1. Uticaj izbora frekvencije i ulazne snage ultrazvuka na ekstrakciju ukupnih fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

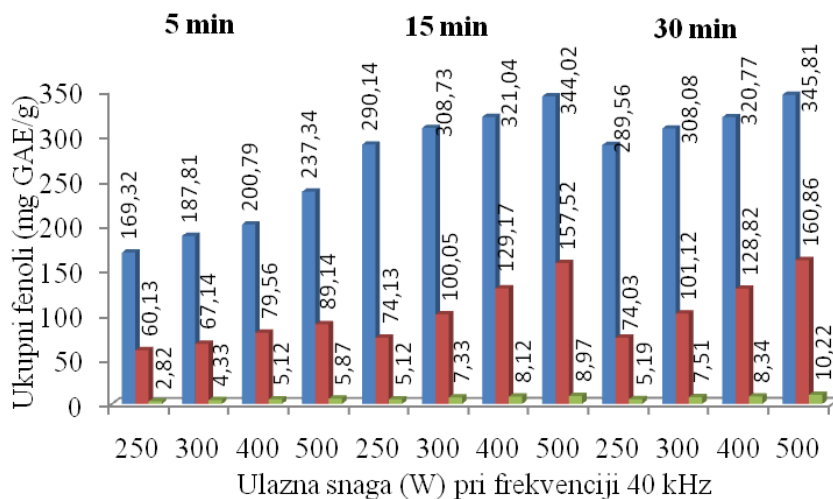
Uticaj frekvencije i ulazne snage uređaja ispitan je menjanjem ovih parametara tokom izvođenja eksperimenata a kao izlazni parametar praćen je ukupni fenolni sadržaj (slike 4.18-4.21).



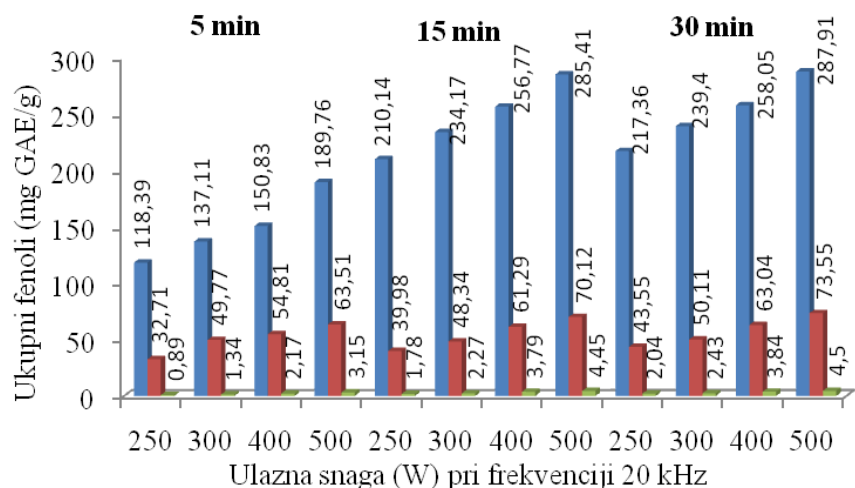
Slika 4.18: Sadržaj ukupnih fenola ekstrahovanih iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac ultrazvučnom ekstrakcijom na frekvenciji 20-40 kHz i ulaznoj snazi ultrazvuka od 500 W



Slika 4.19: Sadržaj ukupnih fenola ekstrahovanih iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac ultrazvučnom ekstrakcijom na frekvenciji 20-40 kHz i ulaznoj snazi ultrazvuka od 250 W



Slika 4.20: Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g) ekstrahovanih iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac ultrazvučnom ekstrakcijom - različita ulazna snaga ultrazvuka (250-500 W) pri frekvenciji od 40 kHz



Slika 4.21: Sadržaj ukupnih fenola ekstrahovanih iz ■ semenki, ■ pokožice i ■ pulpe bobica sorte Vranac ultrazvučnom ekstrakcijom - različita ulazna snaga ultrazvuka (250-500 W) pri frekvenciji od 20 kHz

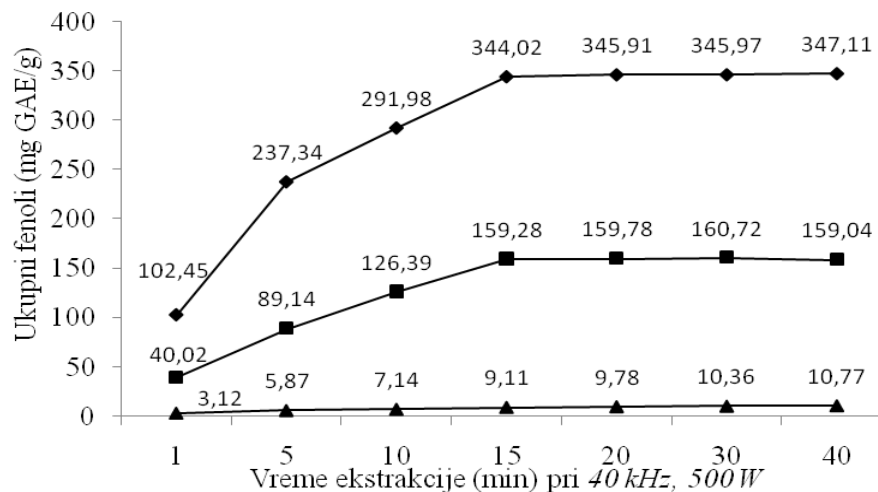
Rezultati pokazuju da se ukupni fenolni sadržaj iz svih ispitivanih ekstrakata povećavao povećanjem frekvencije nezavisno od upotrebene ulazne snage ultrazvuka, od 250 ili od 500 W (slike 4.18 i 4.19). Ovo povećanje je u prosjeku bilo 6% pri povećanju frekvencije ultrazvuka od 20 na 30 kHz i 15% pri povećanju frekvencije ultrazvuka od 30 na 40 kHz, a u prosjeku za 15% kada se ulazna snaga ultrazvuka poveća od 250 na 500 W.

Rezultati ispitivanja promene fenolnog sadržaja sa promenom ulazne snage ultrazvuka na frekvenciji od 20 i 40 kHz, takođe pokazuju porast fenolnog sadržaja kod svih ispitivanih ekstrakata pri povećanju ulazne snage (slike 4.20 i 4.21). Povećanje ukupnog fenolnog sadržaja u prosjeku je bilo 9% kad se ulazna snaga ultrazvuka poveća od 250 na 300 W, 7% kad se ulazna snaga ultrazvuka poveća od 300 na 400 W, 15% kad se ulazna snaga ultrazvuka poveća od 400 na 500 W, a u prosjeku za 16% kada se frekvencija ultrazvuka poveća od 20 na 40 kHz.

Analizom ovih rezultata može se zaključiti da se najveći fenolni sadržaj ekstrakata dobija upotrebom ulazne snage ultrazvuka od 500 W i frekvencije od 40 kHz.

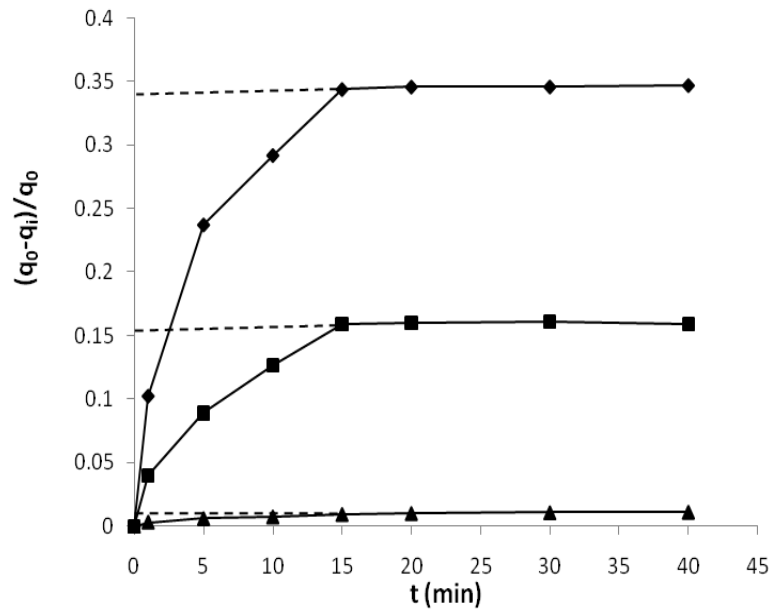
4.2.2. Kinetika ultrazvučne ekstrakcije fenola iz semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac

Pored ulazne snage i frekvencije ispitana je kinetika ultrazvučne ekstrakcije (UE). Dobijeni rezultati pokazali su da optimalno vreme ekstrakcije je 15 min, dok dalje povećanje vremena trajanja ekstrakcije nema uticaja na povećanje prinosa fenolnih jedinjenja (slika 4.22).

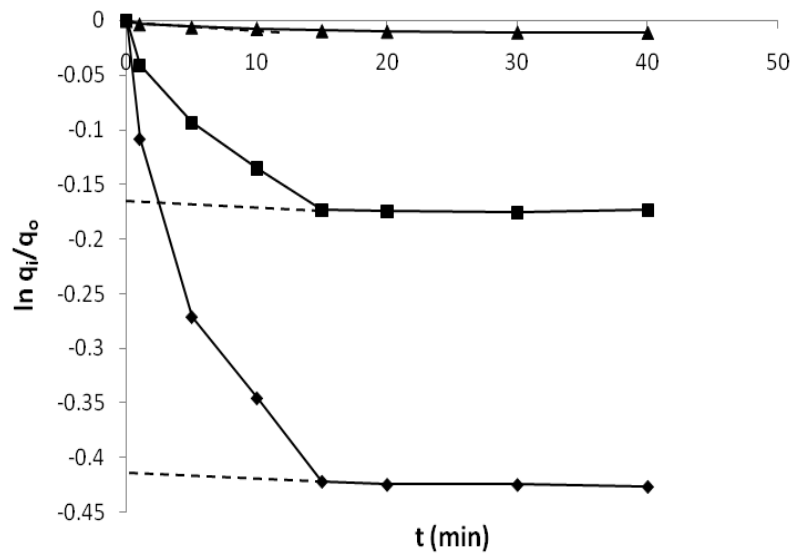


Slika 4.22: Sadržaj ukupnih fenola ekstrahovanih iz \blacklozen semenki, \blacksquare pokožice i \blacktriangle pulpe bobica sorte Vranac ultrazvučnom ekstrakcijom (40 kHz, 500 W) u periodu od 1-40 min

Za kinetička ispitivanja praćen je prinos ukupnih fenola iz ekstrakata semenki, pokožice i pulpe bobica dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom u vremenskom intervalu od 0 do 40 minuta (slike 4.23 i 4.24). Modelovanje kinetike UE ekstrakcije, takođe izvršeno je primenom dva modela (Ponomarjev, 1976), a promena sadržaja ekstraktivnih materija tj. prinosa ukupnih fenola opisan je dvoparametrskim linerizovanim jednačinama 4 i 6.



Slika 4.23: Zavisnost: $(q_0 - q_i) / q_0$ od vremena ultrazvučne ekstrakcije
(◆ semenke, ■ pokožica i ▲ pulpa bobica sorte Vranac)



Slika 4.24: Zavisnost : $\ln q_i / q_0$ od vremena ultrazvučne ekstrakcije
(◆ semenke, ■ pokožica i ▲ pulpa bobica sorte Vranac)

Sa grafika (slike 4.23 i 4,24), gde je prikazana zavisnost $(q_0-q_i)/q_0$ i $\ln q_i/q_0$ od vremena ekstrakcije semenki, pokožice i pulpe bobica sorte Vranac može se uočiti linearna zavisnost u oblasti spore ekstrakcije.

Primećeno je da nakon 15 min ekstrakcije povećanje sadržaja ukupnih fenola je ispod 1% kod svih ispitivanih ekstrakata. Kraće vreme ekstrakcije primenom UE tehnike u odnosu na klasičnu (konvencionalnu) ekstrakciju ukazuje da UE je povoljnija tehnika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ispitivanih uzoraka. Kraćim vremenom trajanja UE obezbeđuje se smanjenje degradacionih procesa bioaktivnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima.

Vrednosti koeficijenata ispiranja i spore ekstrakcije izračunate su metodom najmanjih kvadrata, uzimajući u obzir samo tačke u oblasti spore ekstrakcije (tabela 4.7).

Tabela 4.7: Period brze ekstrakcije (PBE), stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijenata b , k , b' i k' u jednačinama kinetike ultrazvučne ekstrakcije (modeli I i II)

Biljni materijal	Model I				Model II	
	PBE, min	SE, %	b	$k \cdot 10^5, \text{min}^{-1}$	b'	$k' \cdot 10^5, \text{min}^{-1}$
Semenka	15	35	0,343	10,3	0,420	15,7
Pokožica	15	16	0,157	9,6	0,171	11,4
Pulpa	15	1,1	0,083	6,32	0,084	6,38

U tabeli 4.7 su date vrednosti perioda brze ekstrakcije (PBE) i stepena ekstrakcije (SE) koji se ekstraplacijom očitavaju sa grafika prikazanih na slikama 4.23 i 4.24. Period brze ekstrakcije je kod svih uzoraka biljnog materijala isti (15 min) i pokazuje da kod ultrazvučne ekstrakcije nema razlike da li je upotrebljena sveži ili suvi biljni materijal za razliku od konvencionalne ekstrakcije. U ovom periodu se spiranjem i rastvaranjem ekstraktivnih materija iz ćelija biljnog materijala ekstahuje do 35% materija.

Kod uzoraka pokožice i pulpe bobica primećeno je da se vrednosti koeficijenata b i k iz jednačine kinetike UE koji su dobijeni po modelu I neznatno razlikuju od vrednosti koeficijenata b' i k' iz jednačinama kinetike UE dobijenih po modelu II. Kod ispitivanih uzoraka semenki grožđa utvrđeno je da su koeficijenti b i k za 18 i 34% manji od koeficijenata b' i k' .

4.3. PRIMENA METODOLOGIJE ODZIVA POVRŠINE (RSM) ZA UTVRĐIVANJE OPTIMALNIH USLOVA ULTRAZVUČNE EKTRAKCIJE FENOLNIH JEDINJENJA IZ SEMENKI BOBICA

Dalja optimizacija uslova UE vršena je pomoću metodologije odziva površine (RSM) korišćenjem softvera Design Expert (verzija 7.1.6, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Statistički modeli i njihove grafičke slike konstruisani su korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna (CCD). Kao nezavisne promenljive, koje bi potencijalno mogle da utiču na efikasnost ekstrakcije, odabrane su: vreme ekstrakcije (X_1), ekstrakciona temperatura (X_2) i odnos tečno/čvrsto tj. odnos rastvarač/biljni materijal (X_3). Jednofaktorski preliminarni eksperimenti su izvedeni kako bi se odredile vrednosti opsega i centralnih tačaka (tabela 4.8).

Sa ciljem određivanja optimalnih uslova UE fenolnih jedinjenja iz uzoraka semenki grožđa Vranac izvršeno je 20 eksperimenta uključujući šest ponavljanja centralne tačke. Prinos ekstrakcije, ukupni fenolni sadržaj, (+)-katehin, (-)-epikatehin i ukupni proantocijanidini izabrani su kao odzivi za kombinaciju nezavisnih promenljivih (tabela 4.9). Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta ($n = 3$), osim za one koji su se odnosili na centralnu tačku.

Tabela 4.8: Nezavisne promenljive i izabrani nivoi

Promenljive		Nivoi		
Kodirane	Dekodirane	-1	0	1
X1	Vreme ekstrakcije (min)	5	10	15
X2	Temperatura (°C)	30	40	50
X3	Odnos tečno/čvrsto (mL/g)	40	50	60

Ulazni podaci za tri nezavisne promenljive i pet odziva neophodni za CCD eksperimente prikazani su u tabeli 4.9. Odgovarajući odzivi dobijeni su praćenjem vrednosti količine ukupnih fenola i vrednostima za količinu (+)-katehina, (-)-epikatehina i ukupnih proantocijanidina, dobijenim HPLC analizom ispitivanih ekstrakata.

Tabela 4.9: Centralni kompozitni dizajn (CCD) triju promenljivih i odgovarajućih odziva

R.Br. eksp.	Kodirane promenljive			Odzivi				
	X_1	X_2	X_3	Prinos (%)	Ukupni fenoli (mg GAE ^a /g)	(+)-katehin (mg/g)	(-)-epikatehin (mg/g)	Ukupni proantocianidini (mg CE ^b /g)
1	1	-1	1	9,87	149,99	8,17	9,78	68,22
2	0	0	0	9,45	144,77	8,08	9,64	66,07
3	1	1	-1	7,91	129,67	7,43	7,41	63,06
4	0	0	0	9,45	144,77	8,08	9,64	66,07
5	1	-1	-1	7,78	122,04	6,44	6,97	62,15
6	-1	1	-1	6,41	119,42	6,09	6,64	60,97
7	0	0	0	9,44	144,68	8,02	9,6	66,01
8	0	1	0	9,44	144,73	8,05	9,67	66,06
9	-1	-1	-1	6,04	119,04	6,02	6,42	58,6
10	-1	0	1	7,4	130,07	6,72	6,64	64,51
11	-1	-1	1	7,56	129,28	6,48	6,79	62,14
12	1	1	1	9,36	153,06	8,45	9,81	64,37
13	0	1	0	9,87	147,11	8,01	9,70	60,22
14	0	0	-1	8,69	137,01	7,8	8,84	61,07
15	-1	0	0	7,31	127,12	6,34	6,51	61,29
16	0	0	0	9,45	144,77	8,08	9,64	66,07
17	1	0	0	9,85	145,02	7,07	9,69	62,05
18	0	-1	0	9,57	141,20	8,01	8,71	64,78
19	0	0	0	9,44	144,12	8,11	9,58	66,11
20	0	0	0	9,45	144,72	8,06	9,64	66,05

^a ekvivalent galne kiseline; ^b ekvivalenti katehina; Vrednosti odziva su predstavljene kao srednje vrednosti.

Nakon evaluacije svih eksperimenata (tabela 4.9) fitovanjem svih odziva kao funkcije vremena ekstrakcije (X_1), temperature (X_2) i odnosa tečno/čvrsto (X_3), dobijene su sledeće polinomne jednačine:

$$Y = 9,39 + 1,05X_1 + 0,057X_2 + 0,75X_3 + 0,18X_1X_3 - 0,63X_1^2 - X_2^2 - 0,068X_3^2 \quad (7)$$

$$\text{Ukupni fenolni sadržaj} = 142,94 + 7,37X_1 + 1,18X_2 + 8,37X_3 + 3,67X_1X_3 - 3,93X_1^2 - 10,15X_2^2 \quad (8)$$

$$\text{(+) - katehin sadržaj} = 7,95 + 0,61X_1 + 0,11X_2 + 0,33X_3 + 0,006X_1X_2 - 1,3X_2^2 + 0,51X_3^2 \quad (9)$$

$$\text{(-) - epikatehin sadržaj} = 8,35 + 1,01X_1 + 0,036X_2 + 0,8X_3 \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \text{Ukupni proantocijanidini} = & 65,92 + 2,21X_1 - 0,099X_2 + 1,83X_3 - 0,49X_1X_2 - 0,84X_2X_3 \\ & - 1,12X_1^2 - 0,96X_2^2 \end{aligned} \quad (11)$$

Ove polinomne jednačine odgovaraju kvadratnim modelima (jed. 7–9, 11) i linearnom modelu (jed. 10) na osnovu ANOVA testova. (tabela 4.10).

Tabela 4.10: Analiza varijansi (ANOVA) izabranih modela i njihovih koeficijenata

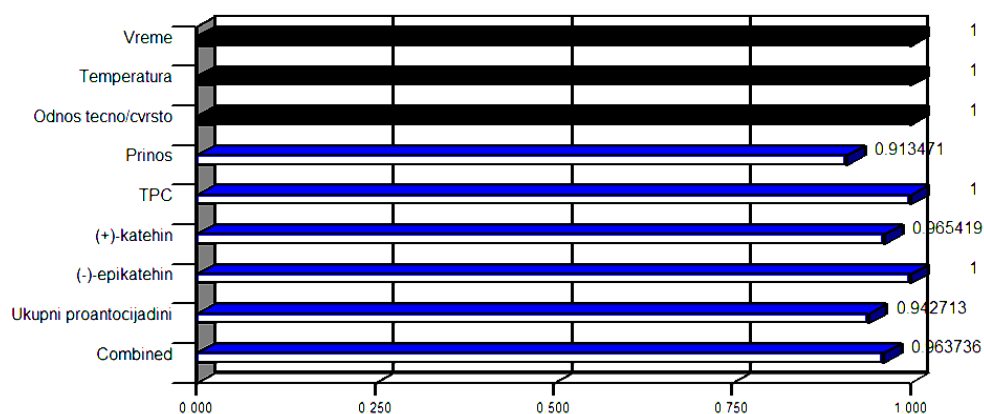
Izvor	Prinos ekstrakcije		Ukupni fenoli		Odziv				Ukupni procijanidini	
	Vrednost		Vrednost		Vrednost		Vrednost		Vrednost	
	F	P	F	P	F	p	F	p	F	p
Model	64,96	<0,0001	36,34	< 0,0001	4,57	0,0168	5,35	0,0105	15,81	0,0002
X₁	229,17	< 0,0001	76,37	< 0,0001	12,29	0,0067	8,20	0,0118	51,06	< 0,0001
X₂	656,96	< 0,0001	19,2	0,0029	5,34	0,0127	11	0,0094	10	0,0017
X₃	127,79	< 0,0001	105,74	< 0,0001	6,90	0,0101	6,14	0,0156	37,91	0,0002
X₁X₂	0,080 ns	0,7834	1,26 ns	0,2913	9,81	0,0094			5,08	0,0494
X₁X₃	5,54	0,0431	15,29	0,0036	0,23 ns	0,6420			2,15 ns	0,1766
X₂X₃	2,97ns	0,1189	0,34 ns	0,5759	1,37 ns	0,2724			7,29	0,0244
X₁²	22,10	0,0011	5,77	0,0398	2,59 ns	0,1421			5,49	0,0447
X₂²	20,31	0,0015	14,12	0,0045	5,40	0,0452			9,4	0,0013
X₃²	122,34	< 0,0001	0,069 ns	0,7981	10,5	0,0083			2,44 ns	0,1527
Odsut -nost fitovanja	0,02 ns	0,3255	0,585 ns	0,3314	0,18 ns	0, 2913	0,57ns	0,1121	0,22 ns	0,3547

ns – vrednosti nisu značajne.

Optimizacijom dizajna, dobijeni su sledeći optimalni uslovi - optimalno vreme ekstrakcije, temperatura i odnos tečno/čvrsto: 14 min, 43 °C i 54 mL/g kada se posmatra prinos ekstrakcije; 14 min, 40 °C i 60 mL/g na osnovu vrednosti ukupnih fenolna i sadržaj (+)-katehina; 15 min, 50 °C i 60 mL/g na osnovu vrednosti sadržaja (-)-epikatehina i 13 min, 40 °C i 60 mL/g na osnovu vrednosti ukupnih procijanidina. Vrednosti svih testiranih odziva povećavaju se povećanjem parametara UE, naročito ekstrakcionog vremena i odnosa tečno/čvrsto. Maksimalne vrednosti odziva dobijene su na temperaturama izvođenja ekstrakcije između 40 °C i 50 °C. Nakon uzimanja u obzir svih parametara (promenljive i odgovarajući odzivi) za proračun optimizacije dizajna, dobijeni su sledeći optimalni uslovi UE: vreme ekstrakcije od 15 min, temperatura od 40 °C i odnos tečno/čvrsto od 58 mL/g.

Bar grafikon prihvatljivosti prikazan je na slici 4.25. Sa grafika se vidi da svaki parametar (promenljive i odgovarajući odzivi) zadovoljavaju kriterijum: vrednosti blizu jedinici su

odgovarajuće. Svi odzivi, pojedinačno kao i njihov kombinovani efekat pokazuju značajnu prihvatljivost.

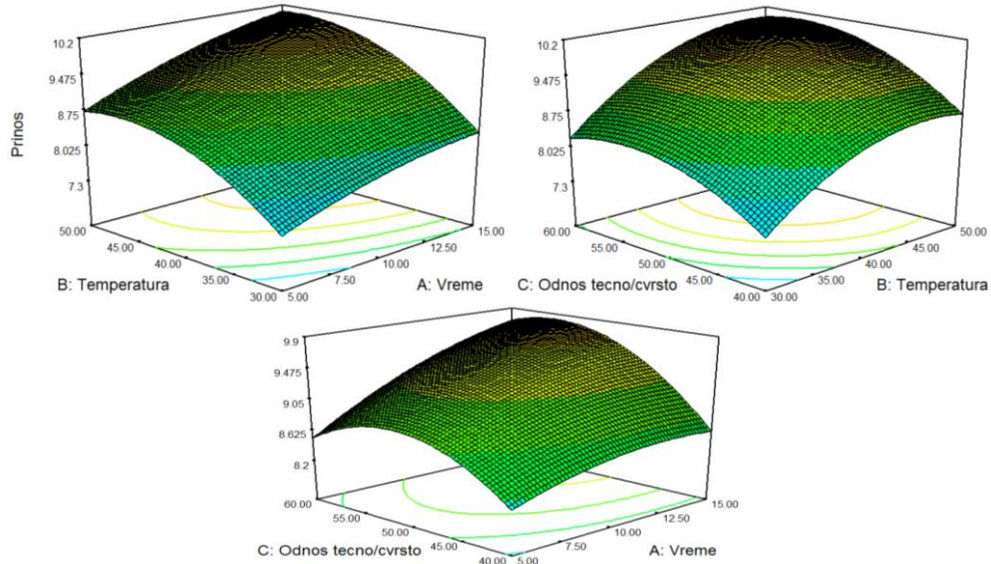


Slika 4.25: Optimizacija većeg broja odziva – bar grafikon prihvatljivosti

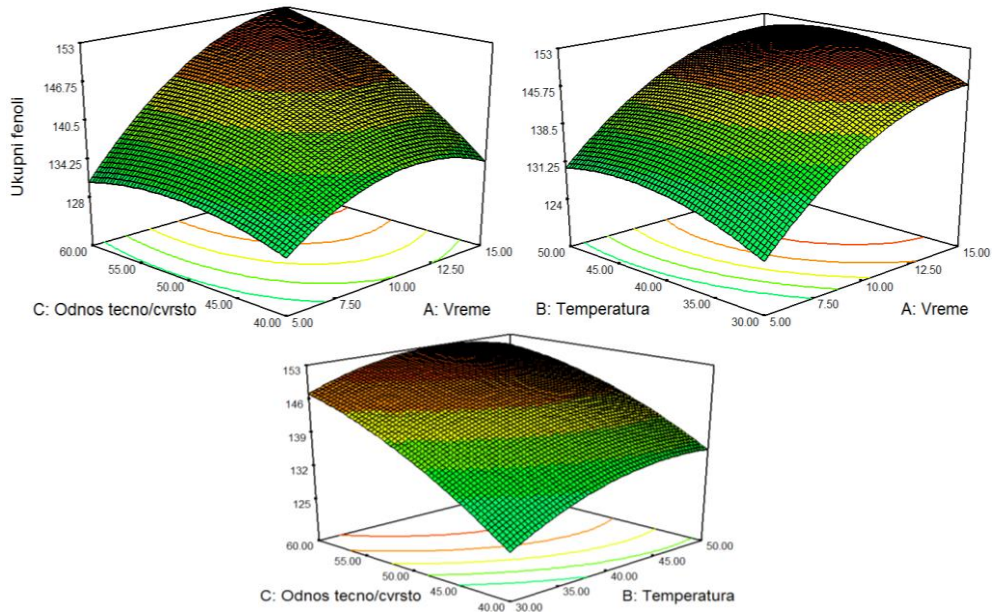
Korišćenjem ovih optimiziranih uslova UE (vreme ekstrakcije od 15 min, temperatura od 40 °C i odnos tečno/čvrsto od 58 mL/g) dobijena su sledeća predviđanja odziva površine:

$Y = 9,78\%$, ukupni fenolni sadržaj = 152,14 mg GAE/g, sadržaj (+)-katehina = 8,46 mg/g, sadržaj (-)-epikatehina = 9,85 mg/g i sadržaj ukupnih procijanidina = 67,33 mg CE/g.

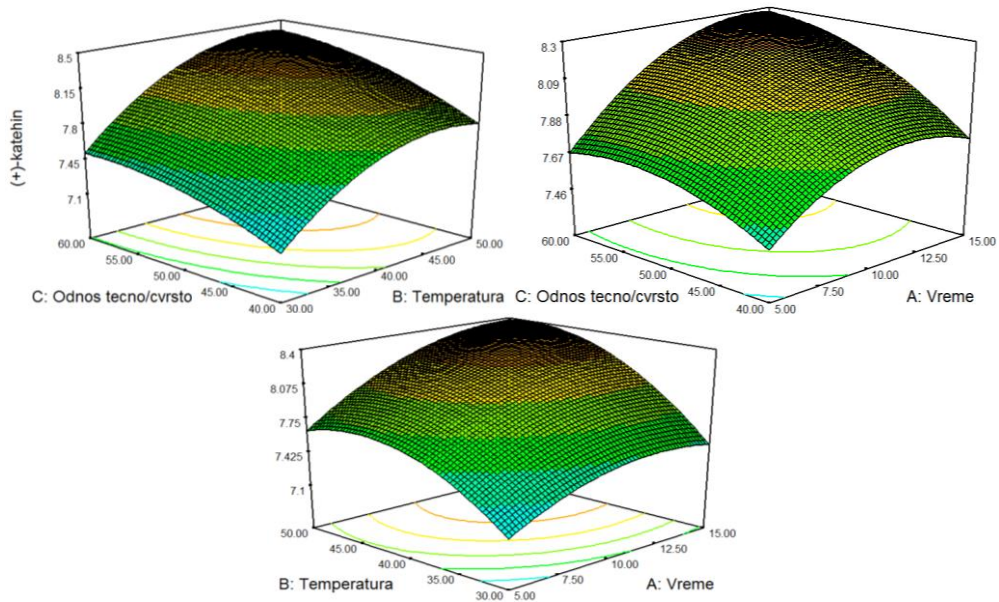
Trodimenzionalni (3-D) grafici pet odziva u funkciji od vremena ekstrakcije, temperature i odnosa tečno/čvrsto prikazani su na slikama 4.26-4.30. Oni predstavljaju grafičku zavisnost vrednosti jednog od odziva u funkciji od dve promenljive dok treća ostaje konstantna.



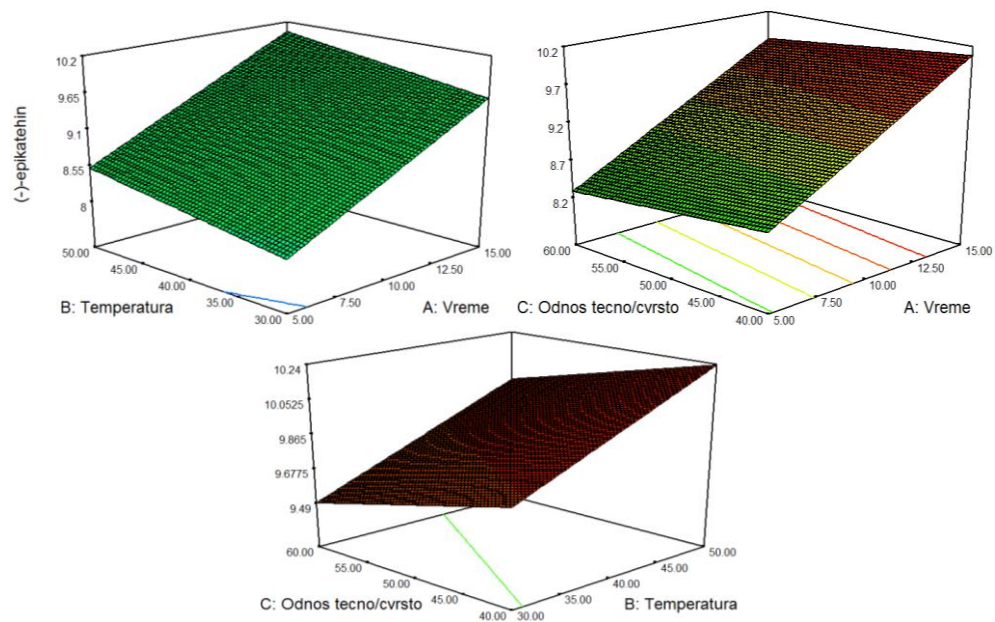
Slika 4.26: 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova UE: ekstrakcionog vremena, temperature i odnosa tečno/čvrsto na prinos ekstrakcije



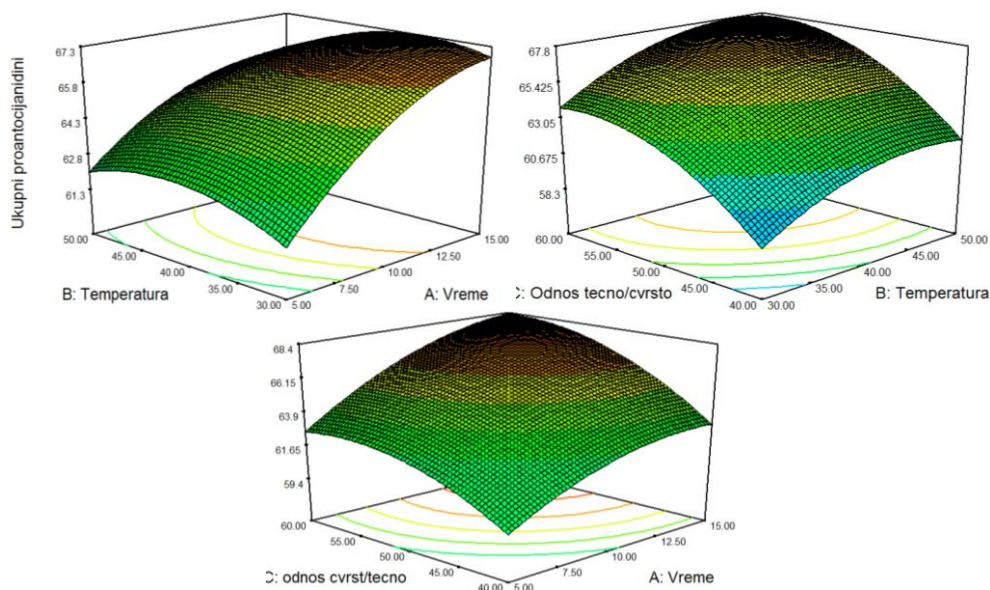
Slika 4.27: 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova UE: ekstrakcionog vremena, temperature i odnosa tečno/čvrsto na sadžaj ukupnih fenola



Slika 4.28: 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova UE: ekstrakcionog vremena, temperature i odnosa tečno/čvrsto na sadržaj (+)-catehina



Slika 4.29: 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova UE: ekstrakcionog vremena, temperature i odnosa tečno/čvrsto na sadržaj (-)-epikatehina



Slika 4.30: 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova UE: ekstrakcionog vremena, temperature i odnosa tečno/čvrsto na sadržaj procijanidina

Analiza fenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost ekstrakata grožđa dobijenih konvencionalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pod istim uslovima izvršena je primenom spektrometrijskih metoda i HPLC analizom. Dobijeni eksperimentalni rezultati za uzorke ekstrakovanih UE (tabela 4.11) u saglasnosti sa prognoziranim rezultatima dobijenim optimizacionim dizajnom.

Takođe, ovi rezultati imaju veće vrednosti svih odziva u poređenju sa rezultatima dobijenih primenom KE i to: povećanje prinosa ekstrakcije iznosilo je 16,90%, ukupnog fenolnog sadržaja 23,76%, sadržaja (+)-katehin 15,41%, (-)-epikatehina 21,24% i procijanidina 23,10%.

Tabela 4.11: Prinos ekstrakcije (Y), ukupni fenolni sadržaj, sadržaj (+)-katehina, (-)-epikatehina, proantocianidina i aktivnost hvatanja radikala (EC_{50}) iz ekstrakta semnki komine grožđa Vranac dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom (UE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 15 min, temperatura 40 °C, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g i konvencionalne ekstrakcije (KE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 60 min, temperatura 40 °C, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g

Istraživani parametri	UE	KE
Y (%)	9,64 ± 0,36a	8,01 ± 0,37b
Ukupni fenoli (mg EGK/g)	148,55 ± 1,89a	113,25 ± 1,91b
(+)-katehin (mg/g)	8,37 ± 0,39a	7,08 ± 0,11b
(-)-epikatehin (mg/g)	9,70 ± 0,34a	7,64 ± 0,41b
Proantocianidini (mg KE/g)	65,94 ± 0,76a	50,71 ± 0,73b
EC_{50} (mg/g)	0,36 ± 0,31b	0,55 ± 0,05a

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD ($n = 3$). Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom se značajno razlikuju ($p < 0,05$), analizirano Tukey-ovim testom.

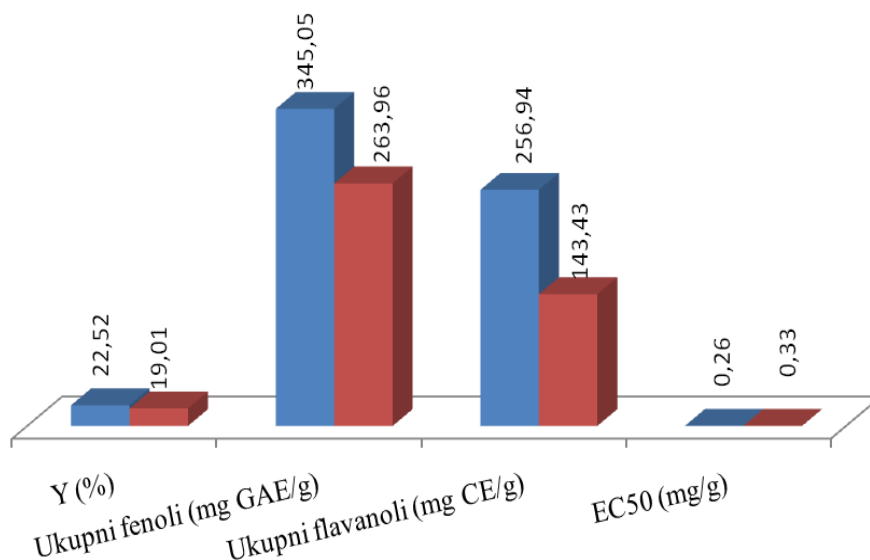
Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata, izražena preko vrednosti EC_{50} u mg/g (tabela 4.11) ukazuje da manje vrednosti EC_{50} odgovaraju jačoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta. Ispitivani ekstrakti dobijeni UE-om pokazali su da imaju 34,54% jaču antioksidativnu aktivnost nego ekstrakti dobijeni KE-om.

Veća antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih UE-om odgovara većem sadržaju ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima, što potvrđuje da fenolna jedinjenja daju doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata (Butkhup i sar., 2010; Jordão i sar., 2012).

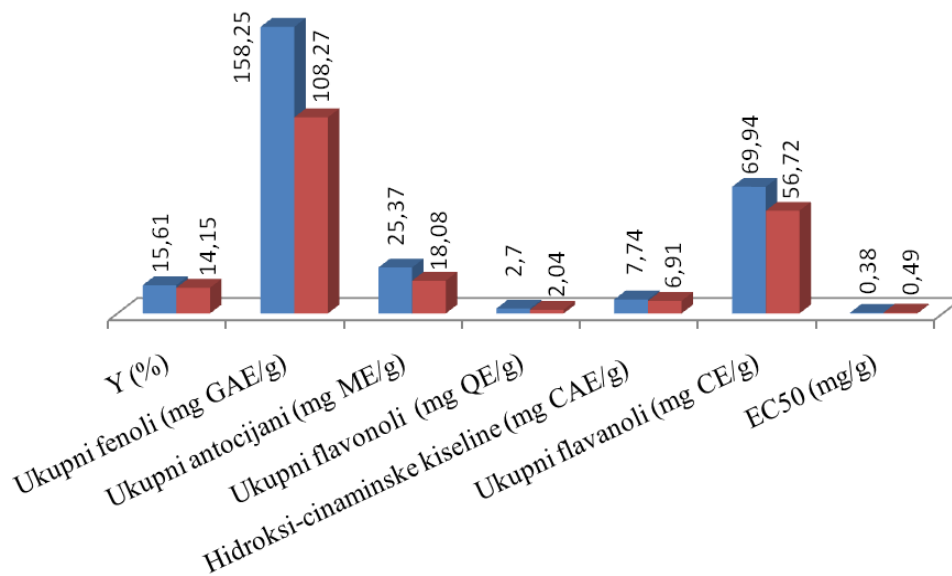
Značajno slabija antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih KE-om može se objasniti činjenicom da za vreme produženog vremena trajanja ekstrakcije do 60 min u odnosu na UE-om dolazi do degradacije antioksidativnih fenolnih jedinjenja.

4.4. UPOREDNA ANALIZA KONVENCIONALNE I ULTRAZVUČNE TEHNIKE ZA EKSTRAKCIJU FENOLNIH JEDINJENJA

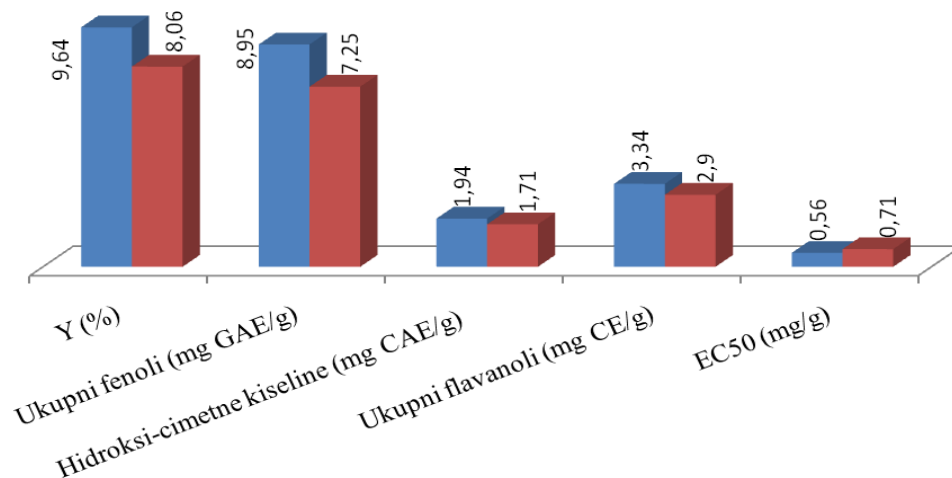
Na osnovu prethodno izloženih rezultata izvršena je uporedna analiza dobijenih vrednosti za ukupni prinos, ukupnih fenola, flavanola, hidrokscimetnih kiselina, antocijana i flavanola, kao i antioksidativne aktivnosti ekstrakata grožđa dobijenih konvencionalnom (KE) i ultrazvučnom ekstrakcijom (UE), pod istim uslovima (slike 4.31, 4.32 I 4.33): .



Slika 4.31: Prinos ekstrakcije (Y), sadržaj ukupnih fenola, flavanola i aktivnost hvatanja radikala (EC_{50}) iz ekstrakta semenki grožđa Vranac dobijenog ■ ultrazvučnom ekstrakcijom (UE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 15 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g i ■ konvencijalnom ekstrakcijom (KE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 60 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g



Slika 4.32: Prinos ekstrakcije (Y), sadržaj ukupnih fenola, antocijana, flavonola, hidroksi-cimetne kiseline, flavanola i aktivnost hvatanja radikala (EC_{50}) iz ekstrakta pokožice grožđa Vranac dobijenih ■ ultrazvučnom ekstrakcijom (UE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 15 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g i ■ konvencijalnom ekstrakcijom (KE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 60 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g



Slika 4.33: Prinos ekstrakcije (Y), sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetne kiseline, flavanola i aktivnost hvatanja radikala (EC_{50}) iz ekstrakta pulpe grožđa Vranac dobijenih ■ ultrazvučnom ekstrakcijom (UE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 15 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g i ■ konvencijalnom ekstrakcijom (KE) pod uslovima: vreme ekstrakcije 60 min, temperatura $40^{\circ}C$, odnos tečno/čvrsto 58 mL/g

Utvrđeno je da je prinos ekstrakcije veći za 15,5% primenom UE u odnosu na KE iz ekstrakata semenki bobica, odnosno za 9,3% iz ekstrakata pokožice i 16,4% iz ekstrakata pulpe.

Ekstrakti dobijeni UE pokazali su značajno veći sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina, flavonola u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom KE. Sadržaj ukupnih fenola iz ekstrakata semenki dobijenih primenom UE je veći za 23,5% u poređenju sa KE-om, odnosno za 31,6% iz ekstrakata pokožice i 19% iz ekstrakata pulpe bobica.

Analiza flavanola je pokazala da je razlika značajno veća, tako da je njihov sadržaj u ekstraktima dobijenim primenom UE iz semenki grožđa 44% veći u poređenju sa KE-om, odnosno za 19% iz ekstrakata pokožice i 13,2% iz ekstrakata pulpe bobica.

Sadržaj hidroksicimetnih kiselina iz ekstrakata pokožice dobijenih primenom UE bio je veći za 10,7% u poređenju sa KE-om i za 11,8% iz ekstrakata pulpe.

Utvrđeno je da ekstrakti pokožice bobica dobijeni primenom UE imaju veći sadržaj antocijana za 28,7% i flavonola za 24,4% u odnosu na ekstrakte dobijene primenom KE.

Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da UE dovodi do većeg prinosa fenolnih jedinjenja u kraćem vremenskom periodu, čime se smanjuje unos energije i degradacija istih. Takođe, dobijeni ekstrakti UE-om pokazuju značajno jaču antioksidativnu aktivnost nego ekstrakti dobijeni KE-om.

Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se kao bolja tehnika od konvencionalne za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz grožđa.

4.5. ISPITIVANJE FIZIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA, FENOLNOG SADRŽAJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI GROŽĐA TOKOM ZRENJA

Na sastav i koncentraciju bioaktivnih komponenata u ekstraktima grožđa pored tehnike ekstrakcije i uslova pod kojima se ona odvija utiču i drugi faktori. Neki od njih odnose se na kvalitet samog biljnog materijala tj. grožđa. Uticaj stepena zrelosti i fiziološka svojstva grožđa na sadržaj fenola ispitivana su u cilju pronalaženja optimalnog vremena berbe grožđa sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja.

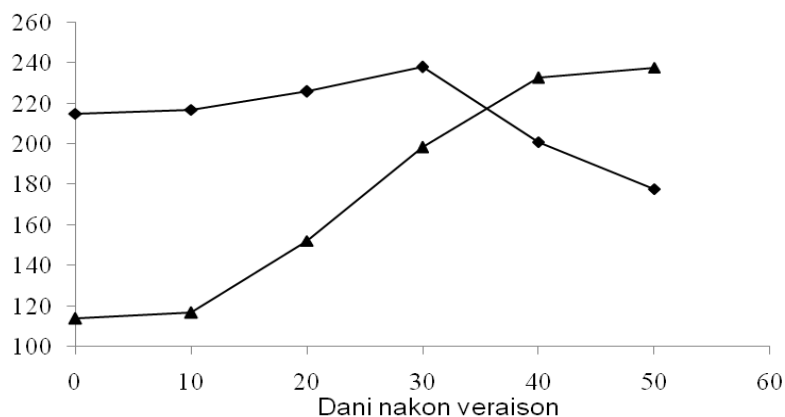
4.5.1. Promena fizioloških svojstva grožđa tokom zrenja

Ispitivana su fiziološka svojstva bobice sorte Vranac (masa grozda, pH, ukupne rastvorljive čvrste materije, sadržaj šećera, potencijalni alkohol i indeks zrelosti) tokom njegovog zrenja (na svaka 10 dana). Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tabeli 4.12 i grafički na slikama 4.34 i 4.35.

Tabela 4.12: Promena fizioloških svojstva bobice tokom zrenja

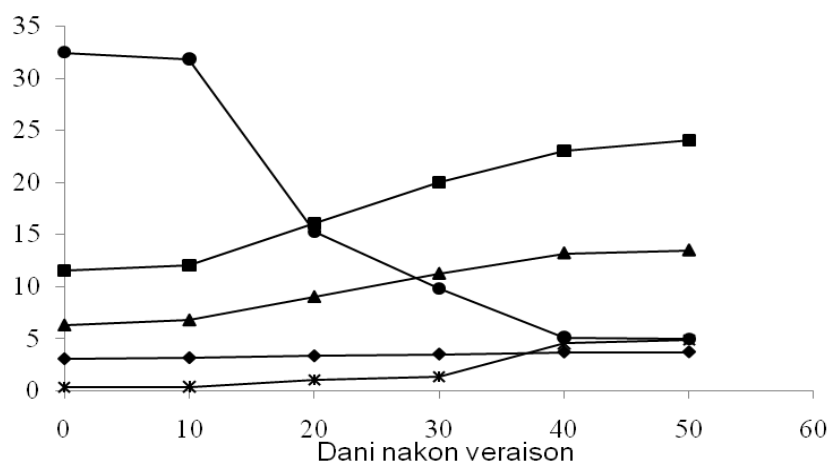
Dani nakon <i>véraison</i>	Masa 100 bobica grožđa (g)	pH	Ukupne rastvorljive čvrste materije (°Brix)	Sadržaj šećera (g/L)	Potencijalni alcohol (zap. %)	Kiselost (g/L)	Indeks zrelosti
0	215	3,03±0,01	11,5±0,5	113,9±1,7	6,32±0,09	32,44±0,25	0,35±0,11
10	217	3,13±0,01	12±0,5	116,7±1,8	6,80±0,15	31,82±0,31	0,37±0,13
20	226	3,31±0,01	16±0,5	152,4±2,3	9,02±0,22	15,21±0,17	1,05±0,10
30	238	3,48±0,02	20±0,5	198,5±3,1	11,24±0,31	9,76±0,10	1,31±0,10
40	201	3,68±0,01	23±0,33	232,7±4,3	13,19±0,11	5,1±0,10	4,50±0,31
50	178	3,70±0,01	24±0,5	237,9±2,6	13,46±0,17	4,95±0,14	4,84±0,24

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3).



Slika 4.34: Promene u fiziološkom sastavu bobice tokom zrenja: ◆ masa 100 bobica (g) i ▲ sadržaju šećera u pulpi (g/L)

Kao što se vidi sa slike 4.34, nakon šarka - *veraison*, koncentracija šećera u pulpi konstantno raste (pedesetog dana nakon šarka - *veraison* porasla je za ukupno za 52,2%), dok se masa bobica nakon trideset dana smanjila (do pedesetog dana za 25,2%), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima drugih sorti (Downey i sar., 2003). Neki autori objašnjavaju smanjenje mase bobica deficitom vode u njima tokom zrenja grožđa (Downey i sar., 2003; Krasnow i sar., 2009).



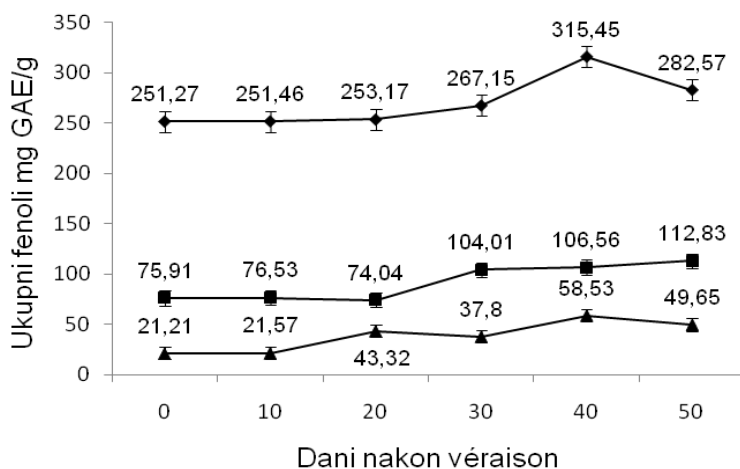
Slika 4.35: Promene u fiziološkom sastavu bobica tokom zrenja: ● kiselost (g/L), ■ °Brix, ▲ potencijalni alkohol (zap.%), ◆ pH i × indeks zrelosti

Vrenosti °Birix, potencijalni alkohol, pH i indeks zrelosti (slika 4.35) rastu tokom zrenja osim vrednosti kiselosti koje su u konstantnom opadanju. Vrenosti °Birix su do pedesetog dana nakon *véraison* porasle za 52%, potencijalni alcohol za 53%, pH vrednost za 10,8%, indeks zrelosti za 92,7%, dok je vrednost kiselosti opao za 84,7%. Slične fiziološke promene koje se javljaju tokom zrenja grožđa zabeležene su i kod drugih ispitivanih sorti (Kennedy i sar., 2002; Kennedy, 2008).

4.5.2. Promena sadržaja fenolnih jedinjenja tokom zrenja grožđa

Promena sadržaja fenolnih jedinjenja tokom zrenja grožđa praćena je preko sadržaja ukupnih fenola sadržaja i ukupnih sadržaja antocijana primenom spektrometrijskih analiza. Kvalitativni sadržaj antocijana u bobici kao i preko sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja ((+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin B2, kvercetin i malvidin-3-glukozid) određeni su primenom HPLC analize.

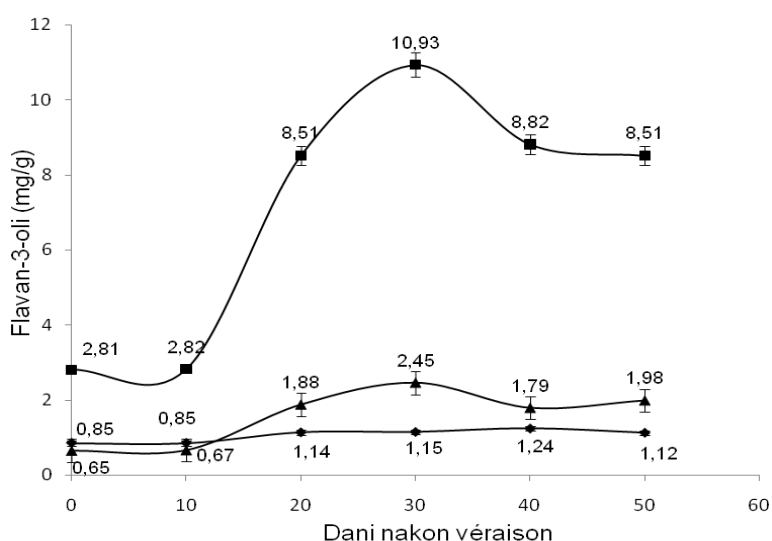
Rezultati ispitivanja ukupnog fenolnog sadržaja u semenkama i pokožici bobice sorte Vranac tokom njegovog zrenja prikazani su na slici 4.36. Ova ispitivanja pokazuju da je tokom zrenja grožđa najveći fenolni sadržaj bio u semenkama, u proseku za 66% veći nego u pokožici i za 97% veći nego u pulpi.



Slika 4.36: Promene u sadržaju ukupnih fenola u semenkama (◆), pokožici (■) i pulpi (▲) tokom zrenja grožđa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD ($n = 3$).

Ukupni fenolni sadržaj u semenkama, pokožici i pulpi za vreme zrenja grožđa se povećavao do četrdesetog dana nakon šarka - *véraison*, a zatim je kod semenki opao za 10,4%, kod pulpe za 15,2%, dok je kod pokožice grožđa porastao za 5,5%, što je bilo u saglasnosti sa literaturnim podacima za druge sorte grožđa (Delgado, 2004; O-Marques i sar., 2005; Canals i sar., 2005 Obreque-Slier i sar., 2010).

Na slici 4.37 prikazani su rezultati praćenja promena sadržaja ukupnih flavan-3-ola ((+)-katehina, (-)-epikatehina i procijanidin B2) u ekstraktima semenki bobica.



Slika 4.37: Promene u sadržaju flavan-3-ola: (+)-katehin (◆), (-)-epikatehin (■) i procijanidina B2 (▲) u semenkama tokom zrenja grožđa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD ($n = 3$)

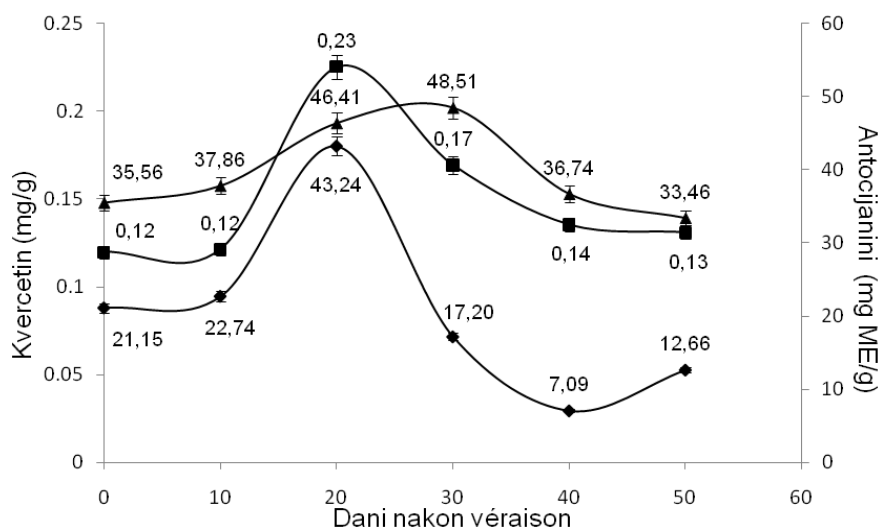
Utvrđeno je da se koncentracija ukupnih flavan-3-ola takođe se menjala za vreme u toku zrenja grožđa, naročito koncentracija (-)-epikatehina i procijanidina B2. Do tridesetog dana nakon šaraka - *véraison*, koncentracija (-)-epikatehina se povećala od 2,81 do 10,93 mg/g, tj. za 74,3%, a procijanidina B2 od 0,65 do 2,45 mg/g, tj. za 73,5%. Nakon tog perioda koncentracija (-)-epikatehina se smanjila na 8,51 mg/g, tj. za 22%, a kod procijanidina B2 na 1,98 mg/g, tj. za 19,2%. Koncentracija (+)-katehina ostala je relativno konstantna, sa manjim variranjem između 0,85 i 1,12 mg/g, tj. za ukupno vreme praćenja koncentracija se promenila za 24%. Drugi autori su

izvestili o sličnoj akumulaciji flavan-3-ola u semenkama za vreme zrenja grožđa (Kennedy i sar., 2000a; Ristic i Ili, 2005; Liu i sar., 2010; Obreque-Slier i sar., 2010).

Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da najprisutnija grupa fenolnih jedinjenja flavan-3-oli sintetiše se u semenkama pre šarka - *véraison* perioda (De Frietas i sar., 2000; Kennedy i sar., 2000a, 2001; Downey i sar., 2003).

Smatra se da je smanjenje koncentracije nekih flavan-3-olnih monomera u semenkama bobice posledica oksidacije fenolnih jedinjenja tokom zrenja. Ova grupa fenolna jedinjenja se nalazi u semenjači omotaču semenke i manje su dostupna ekstakcionom sredstvu u toku maceracije (Cheynier i sar., 1997; Kennedy i sar., 2000b; Hanlin i sar., 2010).

Promena sadržaja ukupnih antocijana u pokožici u toku zrenja bobice prikazana je na slici 4.38. Nihov sadržaj se kretao u opsegu od $33,46 \pm 1,52$ do $48,51 \pm 1,21$ mg ME/g .



Slika 4.38: Promene u sadržaju kvercetina (■), ukupnih antocijana (▲) i malvidina-3-glukozid (◆) u pokožici bobice tokom zrenja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD ($n = 3$).

Antocijani se akumuliraju u pokožici tokom zrenja grožđa, nakon šarka - *véraison*-a i dostižu maksimalnu vrednost pri koncentraciji šećera u pulpi od 198.5 g/L tj 26,7% veća od početne (tridesetog dana nakon šarka- *véraison*). Nakon toga, njihova koncentracija se postepeno smanjuje da bi pri koncentraciji šećera u pulpi od 237,9 g/L (pedesetog dana nakon *véraison*)

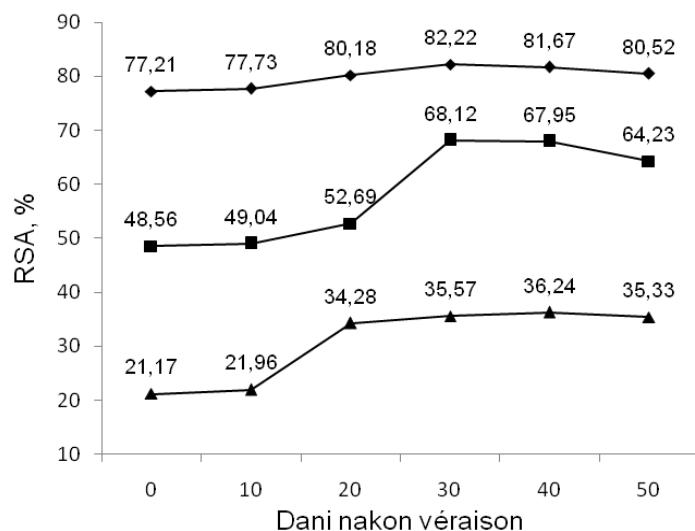
bila za 31% manja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa sličnim istraživanjima na drugim sortama grožđa (Kennedy i sar., 2002; Mori i sar., 2007).

Tokom ovog perioda zrenja grožđa, bobice su izložene jačem zračenju sunca, visokim temperaturama i manjom dostupnošću vode. Od navedenih činilaca, dominantnu pozitivnu ulogu na intenzitet sinteze antocijana ima svetlost. Pozitivan uticaj na sintezu antocijana imaju temperatura vazduha u svetlost. Pri visokoj temperaturi vazduha i visokoj oblačnosti, tj. niskoj osvetljenosti usporen je proces sinteze bojenih materija u bobici. Zato se u trećoj fazi promena u bobici primenjuje agrotehnička mera uklanjanje listova oko grozdova – defolijacija Kao posledica toga u bobici grožđa, može doći do inhibicije biosinteze antocijana (Tarara i sar., 2008). Spoljni vremenski uticaji na zrenje različitih sorti grožđa i njihovo delovanje na akumulaciju antocijana ispitivano je od većeg broja autora (Ryan i Revilla, 2003; De la Hera Orts i sar., 2005; Downey i sar., 2006; Human i Bindon, 2008; Tarara i sar., 2008).

Promena koncentracije kvercetina u pokožici bobice takođe je ispitivana, a rezultati su prikazani na slici 4.40. Do dvadestog dana nakon šarka - *véraison*, tj. pri koncentraciji šećera u pulpi grožđa od 152,4 g/L, koncentracija kvercetina povećavala se u pokožici (koncentracija kvercetina se povećala za 47,8%), a onda lagano opadala da bi pedesetog dana nakon šarka - *véraison*, tj. pri koncentraciji šećera u pulpi grožđa od 237,9 g/L opala za 43,5%. Obreque-Slier i sar. (2010) izvestili su o opadanju količine flavonola kod sorti Cabernet Sauvignon i Carmenere. Drugi autori izvestili su o porastu koncentracije flavonola (Mori i sar., 2004; Munoz i sar., 2007).

4.5.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata grožđa tokom zrenja

Sa ciljem uspostavljanja korelacije između fenolnog sastava grožđa i njegovog antioksidativnog kapaciteta izvršeno je praćenje antioksidativne aktivnosti u različitim vremenskim periodima zrenja grožđa primenom DPPH testa (slika 4.39).



Slika 4.39: Antioksidativna aktivnost ekstrakata (RSA, %) semenki (♦), kožice (■) i pulpe (▲) tokom zrenja grožđa. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD ($n = 3$)

Analiza dobijenih vrednosti je pokazala da najveću antioksidativnu aktivnost imaju ekstrakti semenki (77,73 – 82,22%), zatim ekstrakti pokožice (49,04 – 68,12%) i pulpe (21,96 – 36,24%), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Lacopini i sar., 2008; Anastasiadi i sar., 2010; Butkhup i sar., 2010).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata povećavala se tokom zrenja grožđa sve do tridesetog dana nakon šarka - véraison perioda (kod ekstrakta semenki za 6,1%, pokožice za 28,7% i pulpe za 25%), a zatim se smanjivala (kod ekstrakta semenki za 2% pokožice za 5,7% i pulpe za 2,5%). Slični trend povećanja i smanjenja vrednosti RSA kao i vrednosti koncentracije fenolnih jedinjenja sugeriše postojanje korelacije između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i koncentracije fenola u ekstraktima bobice.

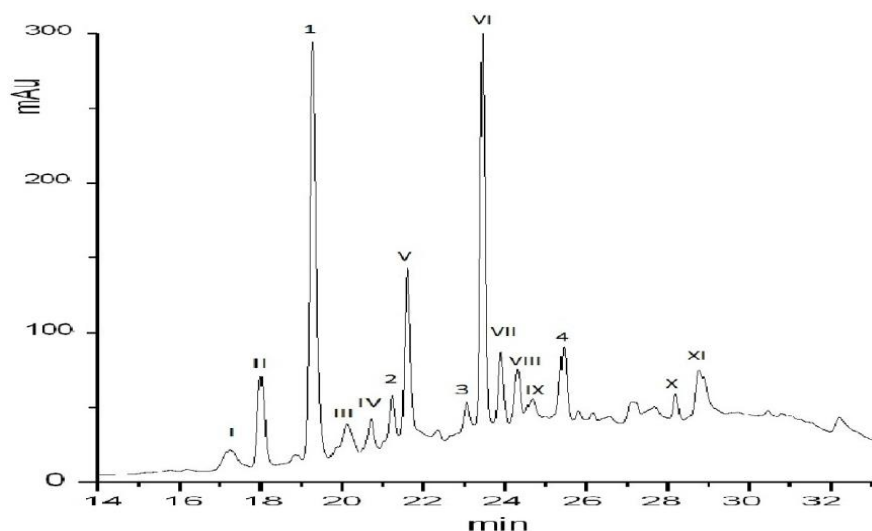
Korelacionom analizom utvrđeno je da postoji povezanost između sadržaja fenolnih jedinjenja u semenkama, pokožici i pulpi bobice i RSA njihovih ekstrakata. Najveća korelacija utvrđena je između RSA i antocijanina ($R^2 = 0.986$, $p < 0.05$), zatim između RSA i ukupnih fenola ($R^2 = 0.952$, $p < 0.05$). Jaka korelacija sugeriše da fenolna jedinjenja značajno doprinose antioksidativnom kapacitetu u ekstraktima bobice.

4.5.4. HPLC analiza ekstrakata semenki i pokožice sorte Vranac pri punoj zrelosti grožđa

Da bi smo utvrdili punu zrelost grožđa, optimalne uslove i vreme berbe grožđa, kao što je prethodno izneto, parćene su fiziološke promene grožđa, fenolni sastav i antioksidativna aktivnost u vremenskom periodu do pedeset dana nakon *véraison*. U skladu sa dobijenim rezultatima (slike 4.34-4.39 i tabela 4.12), berba tridestog dana nakon *véraison* pokazala se kao optimalna za berbu grožđa.

Dobijeni ekstrakti semenki i pokožice bobica od uzoraka grožđa ubranog u ovom optimalnom periodu podvrgnuti su HPLC analizama u cilju karakterizacije njihovog fenolnog sastava.

HPLC hromatogrami ekstrakata semenki i pokožice bobica prikazani su na slikama 4.40 i 4.41.

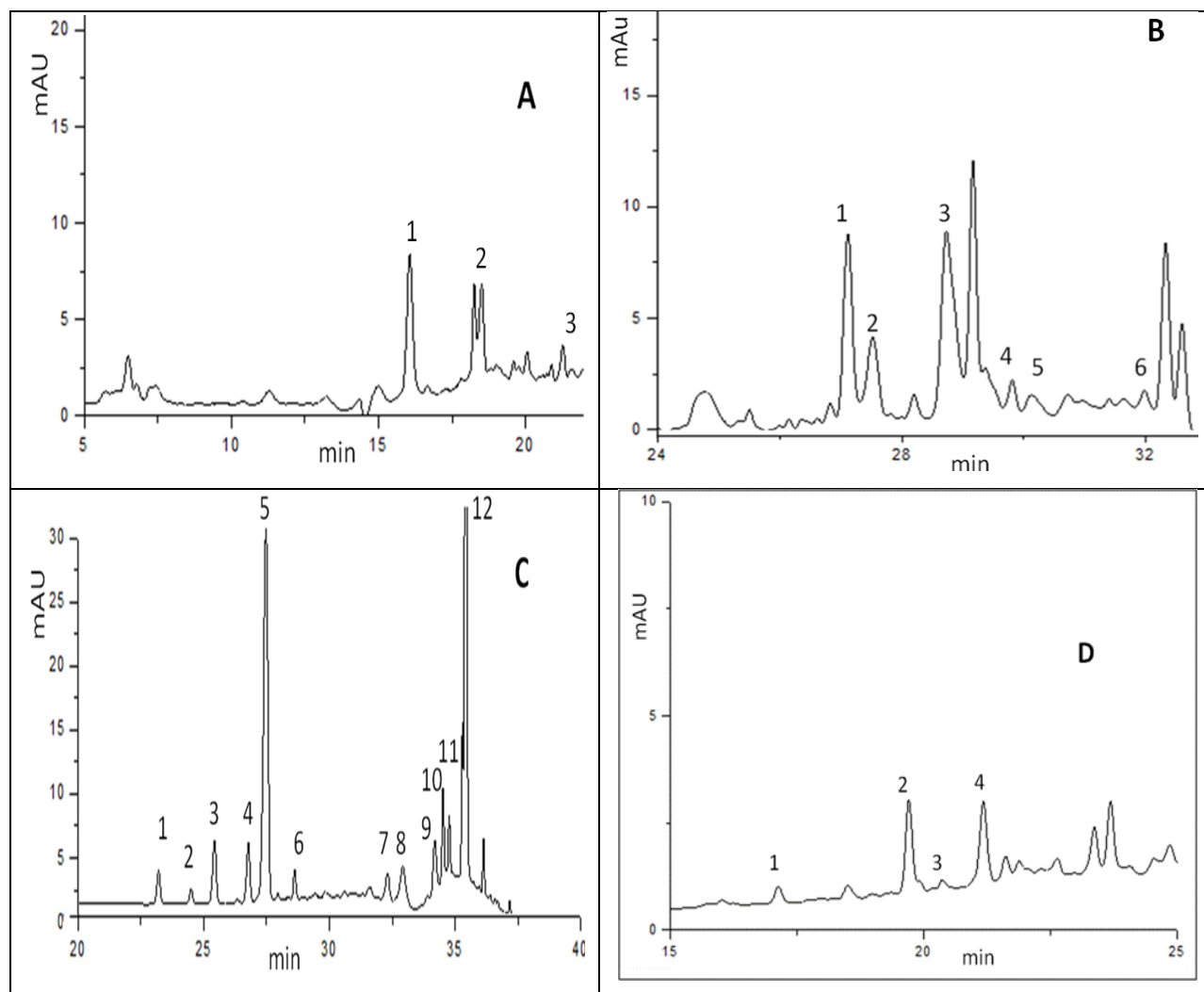


Slika 4.40: HPLC hromatogram ekstrakta semenki bobica sorte Vranac snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$); jedinjenja: **1**(+)-katehin, **2** (-)-procianidin B2, **3**(-)-epikatehin, **4**(-)-epikatehin galat; jedinjenja: **I - XI** su oligomeri flavan-3-ola

HPLC analize pokazale su da su najzastupljenija jedinjenja u ekstraktima semenki flavan-3-ol monomeri i njihovi oligomeri (slika 4.40). Tri flavan-3-ol monomera: (+)-katehin, (-)-epikatehin i (-)-epikatehin galat i dimer, procianidin B2, identifikovani su u ekstraktima semenki. Ukupni njihov sadržaj u ekstraktu iznosi 22,12%.

Takođe je detektovan veći broj flavan-3-ol oligomera (označenih rimskim brojevima od I –XI na slici 4.40). Oni pokazuju slične UV absorpcione spektre kao (+)-katehin, (-)-epikatehin i (-)-epikatehin galat, i pripadaju ne acilovanim procijanidima dobijenim od (+)-katehina i (-)-epikatehina, kao i esterifikovanim procijanidima sa galnom kiselinom dobijenim od (-)-epikatehin galata (Escribano-Bailon i sar., 1992; Revilla i Ryan, 2000). Njihov sadržaj izražen je kao (+)-katehin ekvivalenata (CE) i iznosio je 40.01% u odnosu na ukupni ekstrakt.

Za razliku od semenki, pokožica ima manju koncentraciju flavan-3-ola (hromatogram snimljen fluorescentnim detektorom, slika 4.41-D), ali veću koncentraciju hidroksicimetnih kiselina (hromatogram sniman na 320 nm, slika 4.41-A), flavonola (hromatogram sniman na 360 nm, slika 4.41-B) i antocijana (hromatogram sniman na 520 nm, slika 4.41-C). Od hidroksicimetnih kiselina detektovano je prisustvo kutarne, kafene i *p*-kumarne kiseline, a od flavonola: kvercetin-glukozid, rutin, luteolin-glukozid, miricetin-glukozid, kemferol-glukozid i kvercetin. Antocijanidni sastav ekstrakta pokožice sastojao se od glukozidnih derivata delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina.



Slika 4.41: HPLC hromatogrami ekstrakta pokožice bobica sorte Vranac:

A - snimljen na 320 nm (1 t-kutarna, 2 kafena i 3 p-kumarna kiselina); B – snimljen na 360 nm (1 kvercetin-glukozid, 2 rutin, 3 luteolin-glukozid, 4 miricetin-glukozid, 5 kemferol-glukozid i 6 kvercetin); C – snimljen na 520 nm (1 delfinidin-3-glu., 2 cijanidin-3- glu., 3 petunidin-3-glu., 4 peonidin-3-glu., 5 malvidin-3-glu., 6 delfinidin-3-ac.glu., 7 delfinidin-3-p-kum.glu., 8 malvidin-3-ac.glu., 9 cijanidin-3-p-kum.glu., 10 petunidin-3-p-kum.glu., 11 peonidin-3-p-kum.glu. i 12 malvidin-3-p-kum.glu.) i D - snimljen fluorescentnim detektorom (1 (+)-katehin, 2 procijanidin B2, 3 (-)-epikatehin galat i 4 (-)-epikatehin)

Koncentracija fenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki i pokožice određeni su primenom kalibracionih kriva i prikazani su u tabeli 4.13.

Tabela 4.13: Fenolna jedinjenja u ekstraktima semenke i pokožice grožđa sorte Vranac pri optimalnim uslovima zrelosti

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm ^a)	Semenka	Pokožica
Galna kiselina	0,850 ± 0,012	0,410 ± 0,012
<i>t</i> -kutarna kiselina	tr	0,011 ± 0,002
Kafena kiselina	tr	0,085 ± 0,008
<i>p</i> -kumarna kiselina	tr	0,009 ± 0,001
Kvercetin-glukozid	nd	0,320 ± 0,015
Rutin	nd	0,440 ± 0,013
Luteolin-glukozid	nd	0,240 ± 0,010
Miricetin-glukozid	nd	0,110 ± 0,001
Kemferol-glukozid	nd	0,090 ± 0,001
Kvercetin	nd	0,140 ± 0,01
(+)-katehin	16,13 ± 0,34	tr
(-)-epikatehin galat	9,22 ± 0,21	tr
(-)-epikatehin	12,45 ± 0,32	0,018 ± 0,003
Procijanidin B2	11,33 ± 0,17	0,027 ± 0,004
∑ ostalih procijanidina	80,59 ± 2,47	23,76 ± 1,94
Delfinidin-3-glukozid ^b	nd	3,280 ± 0,220
Cijadinin-3-glukozid	nd	0,980 ± 0,012
Petunidin-3-glukozid ^c	nd	3,600 ± 0,440
Peonidin-3-glukozid ^c	nd	2,410 ± 0,370
Malvidin-3-glukozid	nd	17,090 ± 0,590
∑ glukozidnih derivata ^d	nd	19,170 ± 0,451
∑ Fenolnih kiselina	0,850 ± 0,012	0,515 ± 0,012
∑ Flavonola	-	1,34 ± 0,11
∑ Flavan-3-ola	129,72 ± 5,92	23,81 ± 1,78
∑ Antocijana	-	46,53 ± 3,12
∑ Fenolnih jedinjenja	130,57 ± 5,28	72,19 ± 3,88

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3); nd – nije detektovano; tr – detektovano u tragovima; ^a Suva biljna masa; ^b Koncentracija delfinidin-3-glukozida izražena je preko ekvivalenata cijanidin-3-glukozida (mg CE/g); ^c Koncentracije petunidin i peonidin-3-glukozida izražene su preko ekvivalenta malvidin-3-glukozida; ^d Suma derivata malvidin-, delfinidin-, cijanidin-, petunidin- and peonidin-3-glukozida (acetil i kumaril) izražena je preko ekvivalenta malvidin-3-glukozida (mg ME/g).

Rezultati iz tabele 4.13 pokazuju različitu koncentraciju fenolnih jedinjenja u semenkama i pokožici bobica sorte Vranac.

Od fenolnih kiselina, u semenkama galna kiselina bila je predominantna, dok su hidroksicimetne kiseline prisutne samo u tragovima. Koncentracija galne kiseline bila je 51,8%

veća u ekstraktima semenki nego u ekstraktima pokožice bobica. Najzastupljenija hidrokscimetna kiselina u ekstraktima pokožice bila je kafena kiselina, čija je koncentracija bila 87% veća od *t*-kutarne kiseline i za 89% od *p*-kumarinske kiseline.

Butkhup i sar. (2010) našli su galnu kiselinu u ekstraktima semenki u koncentraciji od 0,278 mg/g i pokožice od 0,164 mg/g, kafenu kiselinu u semenkama od 0,0048 mg/g i pokožici od 0,0158 mg/g, kao i elaginsku i ferulnu kiselinu, ali ne i *t*-kutarnu i *p*-kumarnu kiselinu. Anastasiadi i sar. (2010) identifikovali su galnu i kaftarnu kiselinu kao jedine prisutne fenolne kiseline u semenkama i pokožici nekih grčkih sorti grožđa *Vitis vinifera*.

Vrednosti koncentracija pojedinih flavonolnih jedinjenja u pokožici pri optimalnoj zrelosti grožđa (tabela 4.13) pokazuju da su glukozidi kvercetina, luteolina, miricetina i kemferola dominantna jedinjenja (zastupljeni sa 23,9; 17,9; 8,2 i 6,7%, po redu javljanja), ali takođe su prisutni, u manjoj količini i aglikoni kvercetina (10,4%), što je u saglasnosti sa rezultatima flavonolnog sastava pokožice drugih sorti kao što su: Syrah, Cabernet Gernischt, Cabernet Sauvignon, Merlo, Gamay, Pinot Noir i Shiraz (Jin i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010).

Najzastupljeniji flavonol u pokožici bobica sorte Vranac bio je rutin sa 32,8% u odnosu na ukupni flavonolni sadržaj, što je u saglasnosti sa literurnim podacima (Lacopini i sar., 2008; Butkhup i sar., 2010).

Koncentracija kvercetin-3-glukozida bila je 0,32 mg/g, što je u saglasnosti sa istraživanjima drugih autora za druge sorte grožđa gde su koncentracije kvercetin-3-glukozida bile u granicama od 0,0103 do 0,358 mg/g sbm (Jin i sar., 2009; Obreque-Slier i sar., 2010). Prisustvo flavonolnih aglikona (najčešće kvercetina) u ekstraktima pokožice posledica je progresivne hidrolize glikozida koja nastaje kao rezultat ekstrakcije pokožice u kiseloj sredini (Downey i sar., 2007).

Na osnovu rezultata iz tabele 4,10 može se zaključiti da su flavan-3-oli iz semenki grožđa znatno zastupljeniji od flavan-3-oli iz pokožice bobica sorte Vranac. Njihova koncentracija u smenkama bila je veća za 81,6% od koncentracije flavan-3-ola u pokožici, što je u saglasnosti sa nađenim podacima u literaturi (De Freitas i sar., 2000; Revilla i Ryan, 2000; Sun i sar., 2001; Downey i sar., 2003; Lacopini i sar., 2008; Obreque-Slier i sar., 2010; Liu i sar., 2010).

Tri flavan-3-olna monomera: (+)-katehin, (-)-epikatehin i (-)-epikatehinalat, indetifikovana su u semenkama grožđa, čiji je sadržaj iznosio 29,1% od ukupnog sadržaja flavn-3-olnih jedinjenja.

Najzastupljeniji flavan-3-ol je (+)-katehin (12,4%), dok koncentracija (-)-epikatehin galata je najmanja (7,1%), što je u saglasnosti sa predhodno objavljenim podacima (Kennedy i sar., 2000a; Downey i sar. 2003; Liu i sar., 2010; Butkhuip i sar., 2010; Liu i sar., 2010). Lacopini i sar. (2008) našli su sledeće koncentracije (+)-katehina u semenkama grožđa sorti Merlo, Cabernet Sauvignon, Canaiolo, Colorino Vino, Foglia Tonda i Montepulciano: 1,38; 1,41; 1,40; 1,24; 0,67 i 2,05 mg/g sbm, po redu javljanja, i nešto nižu koncentraciju (-)-epikatehina: 1,31; 1,27; 2,05; 0,89; 0,47 i 1,64 mg/g sbm, po redu javljanja.

Nađeno je da su koncentracije flavan-3-olnih oligomera – procijanidina u semenkama i pokožici značajno veće u poređenju sa monomerima (Sun i sar., 2001; O-Marques i sar., 2005).

U pokožici bobica sorte Vranac od flavan-3-olnih jedinjenja detektovan je (-)-epikatehin ($0,018 \pm 0,003$ mg/g sbm) i procijanidin B2 ($0,027 \pm 0,004$ mg/g sbm), što čini 0,2% od ukupnog sadržaja flavan-3-ola iz ekstrakata pokožice bobica sorte Vranac.

Jin i sar. (2009) otkrili su prisustvo (+)-katehina u pokožicama bobica sorti Syrah, Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt, Merlo, Gamay, Yan 73 i Pinot Noir (0,034; 0,023; 0,016; 0,013; 0,028; 0,044 i 0,008 mg/g sbm, po redu javljanja), kao i odsustvo kod sorti: Zinfel i Muscat Rose. Ovi autori našli su (-)-epikatehin u pokožici Cabernet Gernischt, Merlo i Yan 73 (0,016; 0,037 i 0,079 mg/g sbm, po redu javljanja), ali ne i u pokožici Cabernet Sauvignon, Syrah, Gamay, Pinot Noir, Zinfel i Muscat Rose. Takođe, u ovoj studiji, u pokožicama sorti Pinot Noir, Zinfel i Muscat Rose nije pronađen procijanidin B2, dok je u drugim sortama potvrđeno prisustvo procijanidina B2 u koncentraciji od 0,007 mg/g u Cabernet Gernischt do 0,037 mg/g sbm u pokožicama sorte Merlo.

Sastav antocijana u pokožici bobica Vranac pri optimalnom periodu zrelosti (slika 4.41) pokazao je da su najzastupljenija pet monoglukozida antocijanidina: delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin. Njihov sadržaj je 27,3 mg/g odnosno 58,8% od koncentracije ukupnih antocijana.

Takođe, detektovani su u manjoj količini acetil i kumaril monoglukozidni derivati ovih pet antocijana (19,17 mg ME/g, odnosno 41,2% od ukupnih antocijana).

Malvidin-3-glukozid je najzastupljeniji, sa 36,7% od sadržaja ukupnih antocijana, a redosled ostalih glukozida je: petunidin (7,7%) > delfinidin (7%) > peonidin (5,2%) > cijanidin (2,1%), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Tako na primer, Jin i sar. (2009) su identifikovali malvidin-glukozid da je najzastupljeniji antocijanin u devet crvenih sorti grožđa, sa

a koncentracijom od 3,058 do 7,459 mg/g sbm: delfinidin, petunidin, peonidin i cijanidin (0,048 – 6,97; 0,077 – 4,91; 0,307 – 3,342 i 0,041 – 3,118 mg/g sbm, po redu javljanja).

4.6. ANALIZA UTICAJA SPOLJNIH FAKTORA NA FIZIOLOŠKA SVOJSTVA I FENOLNI SADRŽAJ GROŽĐA VRANAC I MERLO TOKOM ČETIRI UZASTOPNE SEZONE

Sadržaj fenola u grožđu varira od sezone do sezone, a razlog promeni između ostalog ranije navedenog mogu biti faktori spoljne sredine (Downey i sar., 2006). Jedinstven pojam “terroir“ to objašnjava. “*Teroa*” je francuska reč, poreklom iz Burgundije i objedinjuje sve neophodne činioce za nastanak specifičnog vina jednog regiona: geologiju, pedologiju, klimu, uticaj hidrologije, položaj vinograda, sortiment (lozna podloga i plemka), obradu i način proizvodnje vina.

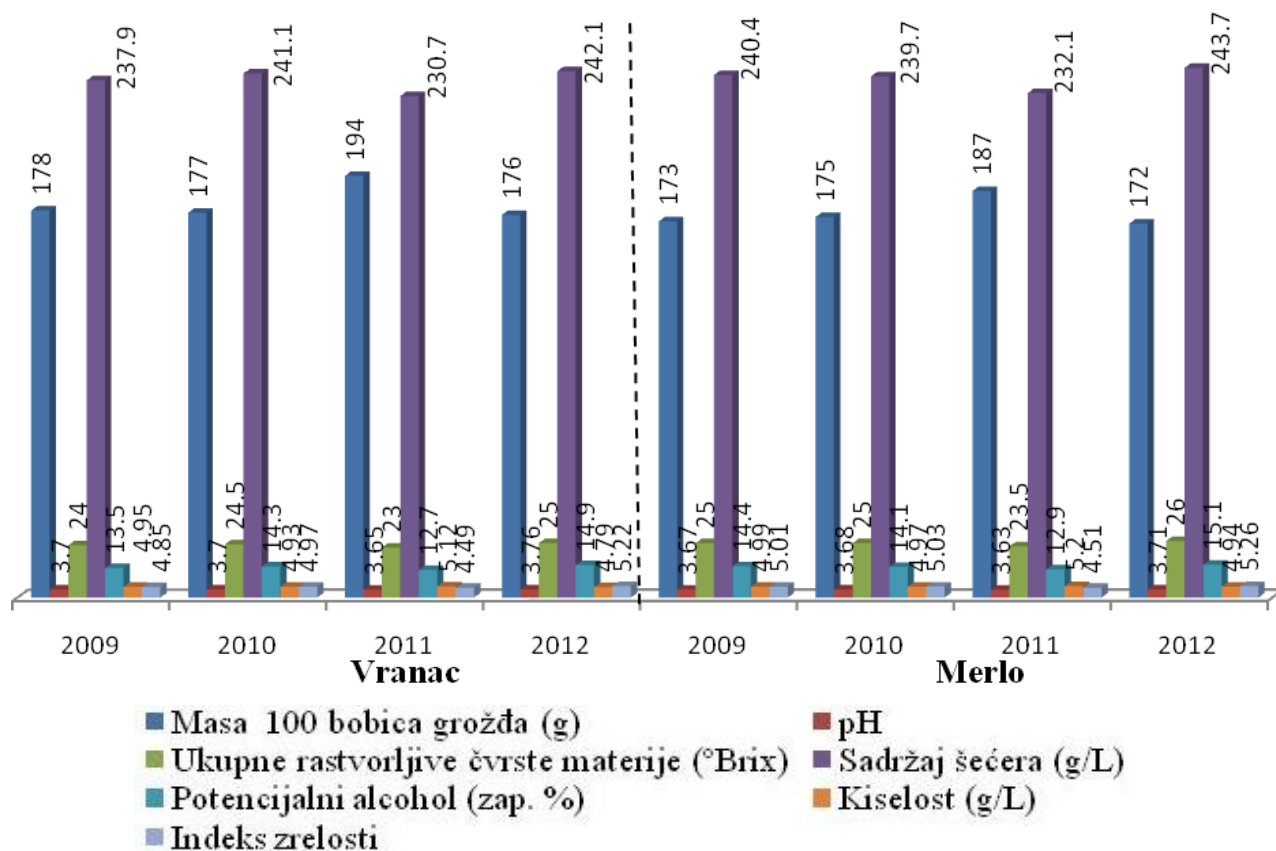
U faktore spoljne sredine koji bi potencijalno mogli da utiču na fenolni sastav grožđa posebno se izdvaja temperatura vazduha, broj sunčanih dana i padavine. Temperatura vazduha i sunčevo zračenje bitni su za normalno funkcionisanje biljke tj. za fotosintezu, proizvodnju ugljenihhidrata u plodu i značajno utiču na sintezu sekundarnih metabolita kao što su fenoli (Kennedy i sar., 2000a). Deficit vode (smanjena količina padavina) može takođe da utiče na normalan razvoj biljke i sintezu fenolnih jedinjenja.

Da bi se ispitao uticaj spoljnih faktora na fiziološka svojstva, kao i sasav i sadržaj fenola u bobici ispitivani su uzorci grožđa sorti Vranc i Merlo. Uzorci su uzimani tokom četiri uzastopne sezone od 2009 do 2012. godine.

Reprezentativni uzorci grožđa Vranc i Merlo u vreme pune zrelosti sakupljeni su sa iste lokacije iz istih markiranih čokota od 2009 do 2012. godine. Svi uzorci pripremani su i analizirani pod identičnim uslovima. Rezultati dobijenih analiza prikazani su na slikama 4.46-4.49.

Upoređujući dobijene vrednosti fizioloških svojstva (masa bobica, °Brix, pH, potencijalni alkohol, sadržaj šećera, kiselost i indeks zrelosti) grožđa kod obe sorte, Vranc i Merlo, za ove četiri godišnje sezone (slika 4.42), može se uočiti da postoje razlike u zavisnosti sezone zrenja grožđa, a najizraženije su 2011. i 2012. godina.

Sva ispitivana fiziološka svojstva su pokazala veće vrednosti u 2012. godini (u proseku kod obe sorte za 8% - °Brix; 3% - pH; 15% - potencijalni alkohol; 5% - sadržaj šećera i 14% - indeks zrelosti) osim mase bobica i kiselosti koje su bile veće u 2011. godini i to za 9% i 6,5%, po redu javljanja. Povećane vrednosti mase bobica i kiselosti u 2011. godini su posledica veće količine padavina u letnjim mesecima tj. smanjenom količinom sunčanih dana u ovoj godini.

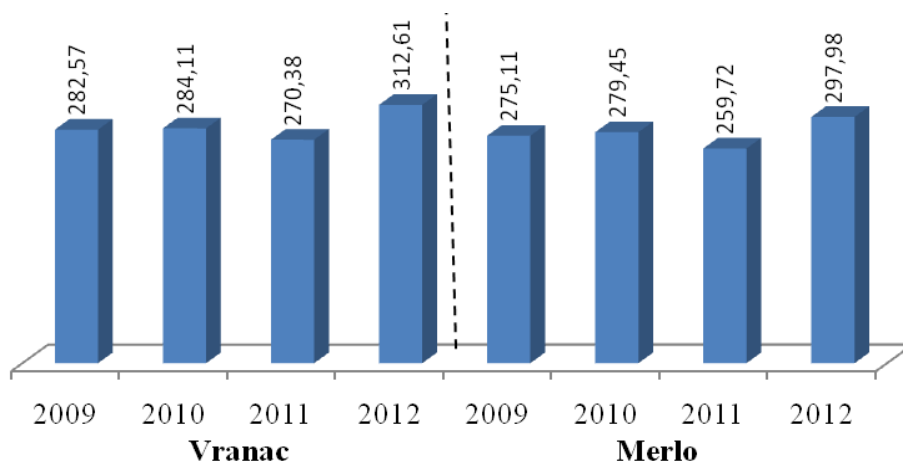


Slika 4.42: Fiziološke karakteristike bobica sorte Vranac i Merlo iz uzoraka sakupljenih od 2009 do 2012 godine

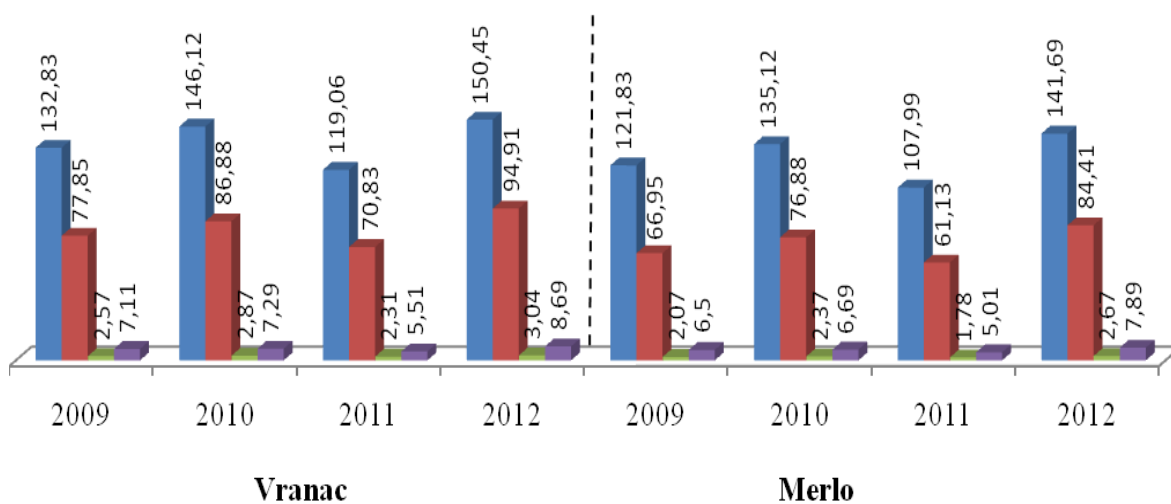
Utvrđeno je da sezona zrenja u 2011. godini bila najnepovoljnija za biosintezu fenolnih jedinjenja. Nasuprot tome, u 2012. godini najviše prosečne temperature i najviše sunčanih dana tokom godine su omogućile razvoj i sazrevanje grožđa.

Sadržaj ukupnih fenola u semenkama u 2012. godini bio je veći u odnosu na 2011. godinu u proseku, kod obe sorte grožđa, za 14%, odnosno pokožici za 20% i pulpi bobice za 5%.

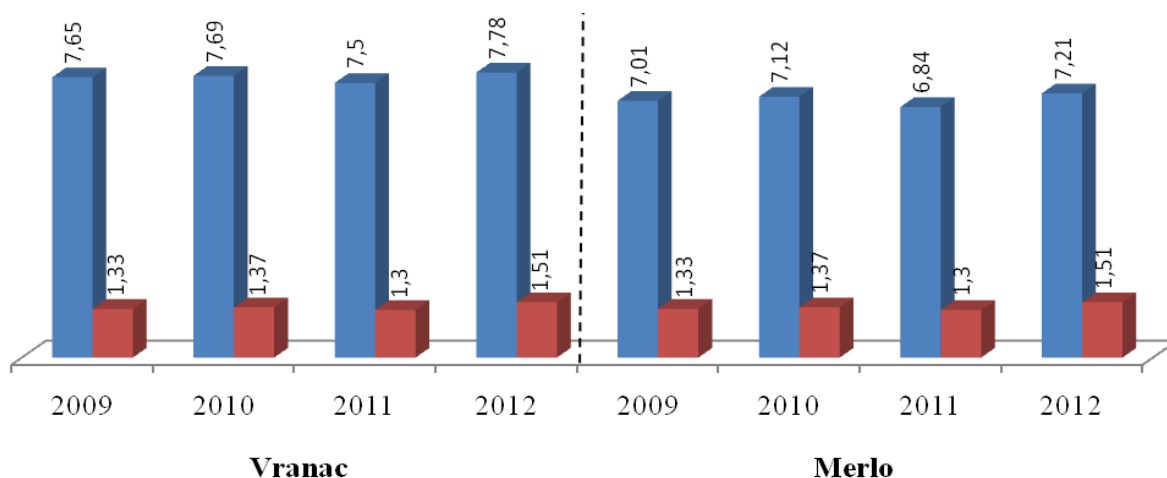
Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u pokožici bobica u 2012. godini bio je veći u odnosu na 2011. godinu u proseku kod obe sorte grožđa za 36%, odnosno u pulpi bobice za 14%. Takođe u pokožici bobice obe sorte sadržaj flavonola i antocijana u 2012. godini bio je veći u odnosu na predhodnu godinu u proseku za 24% i 25%, po redu javljanja (slike 4.43 - 4.45):



Slika 4.43: Sadržaj ukupnih fenola u semenkama bobice sorte Vranac i Merlo dobijenih spektrometrijskom analizom od uzoraka sakupljenih od 2009-2012. godine



Slika 4.44: Sadržaj ukupnih ■ fenola (mg GAE/g), ■ antocijana (mg ME/g), ■ flavonola (mg QE/g) i ■ hidroksicimetne kiseline (mg CE/g) u pokožici bobice sorte Vranac i Merlo dobijenih spektrometrijskom analizom od uzoraka sakupljenih od 2009-2012. godine



Slika 4.45: Sadržaj ukupnih ■ fenola (mg GAE/g) i ■ hidroksicimetne kiseline (mg CAE/g) u pulpi bobice sorte Vranac i Merlo dobijenih spektrometrijskom analizom od uzoraka sakupljenih od 2009-2012. godine

Koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja semenki i pokožice bobice sorti Vranac i Merlo, sakupljenih tokom četiri uzastopne sezone, određenih HPLC analizom, prikazane su u tabelama 4.14-4.17. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim spektrometrijskim analizama (slike 4.43-4.45). Dobijene koncentracije ovih jedinjenja potvrđuju uslovljenost faktorima spoljne sredine kakve tokom sezona zrenja.

Tabela 4.14: Fenolni sastav (određen HPLC metodom) semenki grožđa sorte Vranac iz uzoraka sakupljenih tokom četiri uzastopne sezone

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm)	Semenka bobica sorte Vranac			
	2009	2010	2011	2012
Galna kiselina	6,13 ± 0,62	6,37 ± 0,69	5,89 ± 0,55	7,10 ± 0,92
(+)-katehin	16,58 ± 1,09	17,39 ± 1,21	14,91 ± 1,27	18,73 ± 2,03
Procijanidin B2	11,23 ± 0,76	13,06 ± 1,03	9,73 ± 0,92	13,96 ± 1,21
∑ ostalih procijanidina	86,34 ± 9,13	89,17 ± 12,05	81,72 ± 8,22	91,67 ± 11,79
(-)-epikatehin galat	9,72 ± 0,77	10,86 ± 1,48	9,02 ± 0,56	12,14 ± 1,55
(-)-epikatehin	12,71 ± 0,89	14,08 ± 1,77	10,15 ± 0,77	15,92 ± 1,49
∑ Flavan-3-ola	136,58 ± 8,67	144,56 ± 10,14	125,53 ± 7,94	152,42 ± 10,57
∑ Fenolnih jedinjenja	142,69 ± 9,43	150,93 ± 10,95	131,42 ± 8,86	159,52 ± 10,92

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3).

Tabela 4.15: Fenolni sastav (određen HPLC metodom) semenki bobica sorte Merlo iz uzoraka sakupljenih tokom četiri uzastopne sezone

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm)	Semenka grožđa sorte Merlo			
	2009	2010	2011	2012
Galna kiselina	6,04 ± 0,51	6,03 ± 0,60	5,67 ± 0,40	6,89 ± 0,57
(+)-katehin	16,28 ± 1,12	16,93 ± 1,43	14,59 ± 1,02	18,06 ± 1,98
Procijanidin B2	11,02 ± 0,37	12,73 ± 1,15	9,47 ± 0,58	13,60 ± 1,33
∑ ostalih procijanidina	85,37 ± 8,45	87,41 ± 11,15	80,39 ± 8,16	90,93 ± 10,45
(-)-epikatehin galat	9,51 ± 0,92	10,23 ± 1,35	8,68 ± 0,66	11,58 ± 1,09
(-)-epikatehin	12,24 ± 0,69	13,08 ± 1,37	9,93 ± 0,70	15,09 ± 1,22
∑ Flavan-3-ola	134,42 ± 7,29	140,38 ± 7,11	123,06 ± 6,56	149,26 ± 7,34
∑ Fenolnih jedinjenja	140,46 ± 7,14	146,41 ± 7,02	128,73 ± 6,38	156,15 ± 7,21

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3).

Tabela 4.16: Fenolni sastav (određen HPLC metodom) pokožice bobica sorte Vranac iz uzoraka sakupljenih tokom četiri uzastopne sezone

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm)	Pokožica bobica sorte Vranac			
	2009	2010	2011	2012
Galna kiselina	2,69 ± 0,22	2,78 ± 0,22	2,11 ± 0,09	3,11 ± 0,19
<i>t</i> -kutarna kiselina	0,89 ± 0,26	0,94 ± 0,19	0,47 ± 0,12	1,25 ± 0,21
Kafena kiselina	0,73 ± 0,19	0,80 ± 0,26	0,63 ± 0,09	1,20 ± 0,14
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,71 ± 0,33	1,83 ± 0,43	1,47 ± 0,21	2,17 ± 0,32
Kvercetin gl. ^b	0,21 ± 0,08	0,28 ± 0,08	0,09 ± 0,02	0,35 ± 0,11
Rutin	0,22 ± 0,07	0,22 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,40 ± 0,15
Luteolin gl.	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,14	0,11 ± 0,02	0,32 ± 0,17
Miricetin gl.	0,18 ± 0,06	0,22 ± 0,09	0,11 ± 0,01	0,40 ± 0,13
Kemferol gl.	0,15 ± 0,05	0,20 ± 0,11	0,09 ± 0,01	0,34 ± 0,16
Kvercetin	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,29 ± 0,11
(+)-katehin	4,15 ± 0,34	4,91 ± 0,51	3,09 ± 0,24	5,67 ± 0,49
Procijanidin B2	8,99 ± 1,27	9,36 ± 1,42	6,87 ± 1,09	10,93 ± 1,57
∑ ostalih procijanidina	21,31 ± 3,01	22,49 ± 3,26	18,98 ± 1,89	24,09 ± 2,81
(-)-epikatehin galat	nd	nd	nd	0,09 ± 0,01
(-)-epikatehin	nd	0,08 ± 0,01	nd	0,11 ± 0,01
Delfinidin-3-gl.	3,15 ± 0,49	3,89 ± 0,31	2,79 ± 0,38	4,14 ± 0,29
Cijanidin-3- gl.	2,91 ± 0,22	3,05 ± 0,32	2,55 ± 0,12	3,95 ± 0,44
Petunidin-3-gl	1,21 ± 0,21	1,38 ± 0,31	1,02 ± 0,09	1,43 ± 0,27
Peonidin-3-gl.	5,23 ± 0,53	5,37 ± 0,33	4,66 ± 0,40	6,12 ± 0,41
Malvidin-3-gl	17,41 ± 1,09	18,53 ± 1,21	16,03 ± 1,11	19,93 ± 1,33
Delfinidin-3-ac. ^c gl.	3,09 ± 0,31	3,84 ± 0,27	2,59 ± 0,30	3,91 ± 0,31
Delfinidin-3-p-kum. ^d gl.	3,22 ± 0,21	4,02 ± 0,32	3,01 ± 0,12	4,89 ± 0,27
Malvidin-3-ac.gl.	3,69 ± 0,40	4,25 ± 0,36	2,77 ± 0,33	5,12 ± 0,44
Cijanidin-3-p-kum.glu.	4,31 ± 0,32	4,97 ± 0,41	3,65 ± 0,21	5,39 ± 0,37
Petunidin-3-p-kum.glu.	1,91 ± 0,11	2,12 ± 0,31	1,23 ± 0,12	2,98 ± 0,22
Peonidin-3-p-kum.glu.	5,82 ± 0,63	6,49 ± 0,57	5,02 ± 0,44	7,58 ± 0,44
Malvidin-3-p-kum.glu.	18,04 ± 1,29	19,22 ± 1,11	16,59 ± 1,04	20,95 ± 1,45
∑ Fenolnih kiselina	6,02 ± 0,43	6,35 ± 0,68	4,68 ± 0,13	7,73 ± 0,29

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm)	Pokožica bobica sorte Vranac			
	2009	2010	2011	2012
∑ Flavonola	1,04 ± 0,12	1,27 ± 0,09	0,59 ± 0,09	2,1 ± 0,07
∑ Flavan-3-ola	34,45 ± 2,91	36,84 ± 2,43	28,94 ± 2,15	40,78 ± 2,92
∑ Antocijana	69,99 ± 3,12	77,13 ± 4,70	61,91 ± 4,20	86,39 ± 4,12
∑ Fenolnih jedinjenja	111,50 ± 1,13	121,59 ± 6,21	96,12 ± 7,10	137,00 ± 6,95

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3); nd – nije detektovano.

Tabela 4.17: Fenolni sastav (određen HPLC metodom) pokožice bobica sorte Merlo iz uzoraka sakupljenih tokom četiri uzastopne sezone

Fenolna jedinjenja (mg/g sbm)	Pokožica bobica sorte Merlo			
	2009	2010	2011	2012
Galna kiselina	2,44 ± 0,17	2,65 ± 0,23	2,01 ± 0,11	3,02 ± 0,24
<i>t</i> -kutarna kiselina	0,65 ± 0,23	0,77 ± 0,21	0,39 ± 0,09	1,12 ± 0,12
Kafena kiselina	0,70 ± 0,22	0,67 ± 0,14	0,53 ± 0,15	1,04 ± 0,09
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,56 ± 0,41	1,65 ± 0,22	1,33 ± 0,11	1,94 ± 0,21
Kvercetin gl. ^b	0,15 ± 0,07	0,22 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,28 ± 0,06
Rutin	0,17 ± 0,06	0,15 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,33 ± 0,09
Luteolin gul.	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,27 ± 0,11
Miricetin gl.	0,16 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,08 ± 0,01	0,35 ± 0,12
Kemferol gl.	0,12 ± 0,05	0,14 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,30 ± 0,13
Kvercetin	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,20 ± 0,11
(+)-katehin	3,79 ± 0,34	4,77 ± 0,23	2,79 ± 0,19	5,37 ± 0,37
Procijanidin B2	8,57 ± 1,27	9,03 ± 1,32	6,49 ± 1,21	10,03 ± 1,07
∑ ostalih procijanidina	20,17 ± 3,01	21,01 ± 3,22	18,01 ± 1,43	22,92 ± 1,93
(-)-epikatehin galat	nd	nd	nd	nd
(-)-epikatehin	nd	nd	nd	0,09 ± 0,01
Delfinidin-3-gl.	3,11 ± 0,49	3,64 ± 0,35	2,50 ± 0,23	3,79 ± 0,25
Cijanidin-3- gl.	2,70 ± 0,22	2,85 ± 0,42	2,14 ± 0,09	3,69 ± 0,24
Petunidin-3-gl.	1,01 ± 0,21	1,22 ± 0,35	0,93 ± 0,13	1,21 ± 0,11
Peonidin-3-gl.	4,96 ± 0,53	5,01 ± 0,36	4,21 ± 0,32	5,93 ± 0,26
Malvidin-3-gl.	16,89 ± 1,09	17,53 ± 1,28	15,78 ± 1,02	19,01 ± 1,11
Delfinidin-3-ac. ^c gl.	2,78 ± 0,31	3,23 ± 0,20	2,39 ± 0,41	3,27 ± 0,24
Delfinidin-3-p-kum. ^d gl.	3,03 ± 0,21	3,92 ± 0,30	2,79 ± 0,14	4,49 ± 0,24
Malvidin-3-ac.gl.	3,34 ± 0,40	3,85 ± 0,32	2,51 ± 0,30	4,98 ± 0,39
Cijanidin-3-p-kum.gl.	4,09 ± 0,32	4,37 ± 0,31	3,22 ± 0,13	5,39 ± 0,28
Petunidin-3-p-kum.gl.	1,71 ± 0,11	2,01 ± 0,30	1,01 ± 0,09	2,98 ± 0,30
Peonidin-3-p-kum.gl.	5,42 ± 0,63	6,09 ± 0,44	4,78 ± 0,23	7,28 ± 0,65
Malvidin-3-p-coum.gl.	17,22 ± 1,29	17,92 ± 1,22	15,97 ± 1,27	18,02 ± 1,09
∑ Fenolnih kiselina	5,35 ± 0,29	5,74 ± 0,33	4,26 ± 0,41	7,12 ± 0,57
∑ Flavonola	0,83 ± 0,29	0,94 ± 0,15	0,39 ± 0,11	1,73 ± 0,41
∑ Flavan-3-ola	32,53 ± 2,43	34,81 ± 1,77	27,29 ± 1,50	38,41 ± 1,44
∑ Antocijana	66,26 ± 6,15	71,64 ± 6,29	58,23 ± 5,22	80,04 ± 6,11
∑ Fenolnih jedinjenja	104,97 ± 8,27	113,13 ± 9,12	90,17 ± 8,34	127,30 ± 9,26

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3); nd – nije detektovano.

Analizom HPLC rezultata utvrđeno je pored promena u koncentracijama fenolnih jedinjenja tokom četiri uzastopne godine zrenja, u ekstraktima pokožice bobice obe ispitivane sorte dolazilo i do promene fenolnog sastava. Tako na primer, flavan-3-oli: (-)-epikatehin i (-)-epikatehin galat nisu bili prisutni u uzorcima u toku svih sezona zrenja (tabele 4.16 i 4.17), što potvrđuje značaj vremenskih uslova (terroir) na fenolni sastav grožđa, a kasnije i vina.

4.7. ISPITIVANJE UTICAJA SORTE GROŽĐA *VITIS VINIFERA* L. NA NJIHOVA FIZIOLOŠKA SVOJSTVA I FENOLNI SADRŽAJ PRIMENOM ANALIZE GLAVNIH KOMPONENATA

Postoji više studija čija je tematika analiza fizioloških svojstva i fenolnog sadržaja grožđa različitog genotipa (Kennedy i sar., 2000a; Downey i sar. 2003; Lacopini i sar., 2008; Anastasiadi i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010; Katalinic i sar., 2010; Liu i sar., 2010). Utvrđeno je da postoje razlike u ovim karakteristikama u zavisnosti od vrsta kojih ima više od 40, kao i između pojedinih sorti unutar vrste.

Na našem podneblju se najviše gaje sorte grožđa koje pripadaju vrsti *Vitis Vinifera* L. Za naša istraživanja od interesa je bilo da se ispituju i uporede fiziološka svojstva i fenolni sastav najzastupljenijih sorti grožđa, kao što je autohtona sorta Vranac i internacionalna sorta grožđa Merlo.

U tom cilju upotrebljena je analiza glavnih komponenti (PCA). Podaci UV i HPLC analiza grožđa sorti Vranac i Merlo sakupljenih od 2009 do 2012. godine (slike 4.42-4.45 i tabele 4.14-4.17) korišćeni su kao ulazni podaci za PCA i to. ukupno 16 varijabli.

PCA je primenjena za identifikaciju skrivenih faktora koji su odgovorni za varijabilnost kvaliteta ispitivanih sorti grožđa. Primenom PCA dobijene su dve glavne komponente koje objašnjavaju oko 96,50% ukupnog varijabiliteta (slike 4.46 i 4.47).

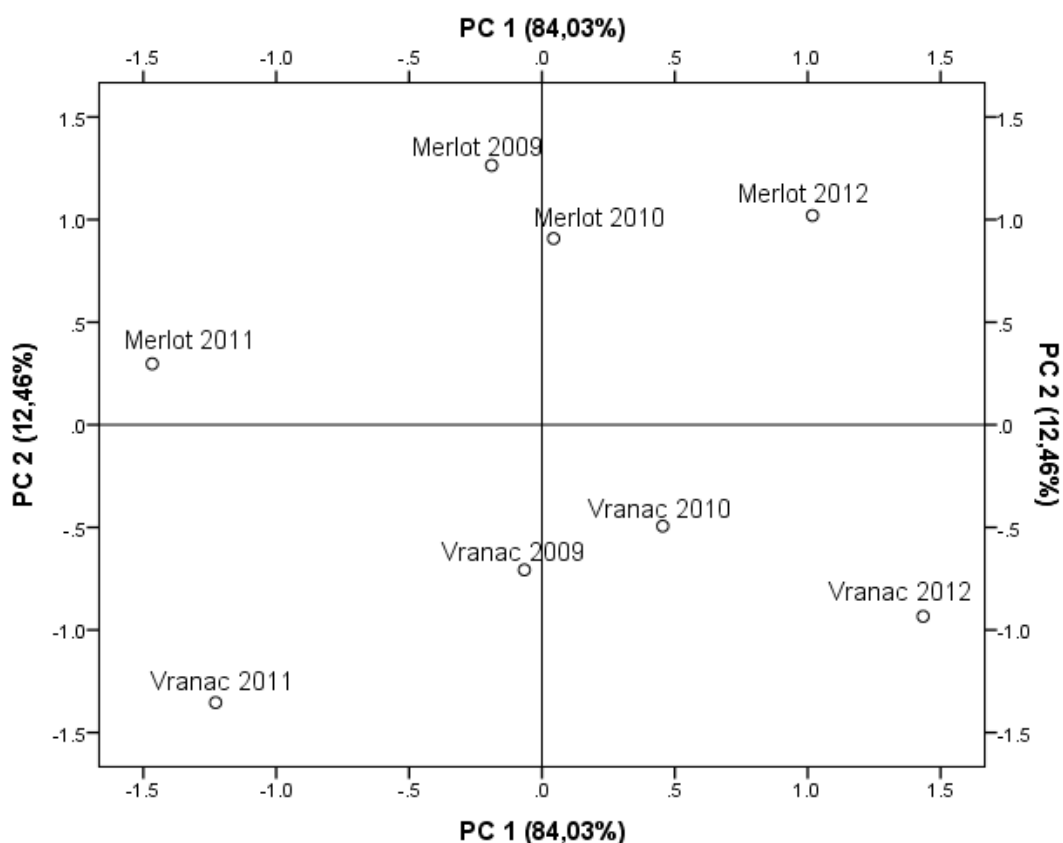
Prva komponenta PC1 doprinosi 84,03% u ukupnom varijabilitetu i najviše je u korelaciji sa koncentracijama fenolnih jedinjenja, delom sa fiziološkim svojstvima grožđa, dok drugi deo fizioloških svojstva (masa bobica i kiselost pulpe) i EC₅₀ su u dobroj korelaciji sa drugom komponentom PC2 čiji je doprinos 12,46% u ukupnom varijabilitetu (slika 4.47).

Može se primetiti jasna razdvojenost između ekstrakata sorte Vranac i Merlo (slika 4.46): ekstrakti grožđa sorte Vranac locirani su u donjem delu grafika, a ekstrakti grožđa sorte Merlo u gornjem delu grafika (negativne - Vranac i pozitivne - Merlo vrednosti PC2).

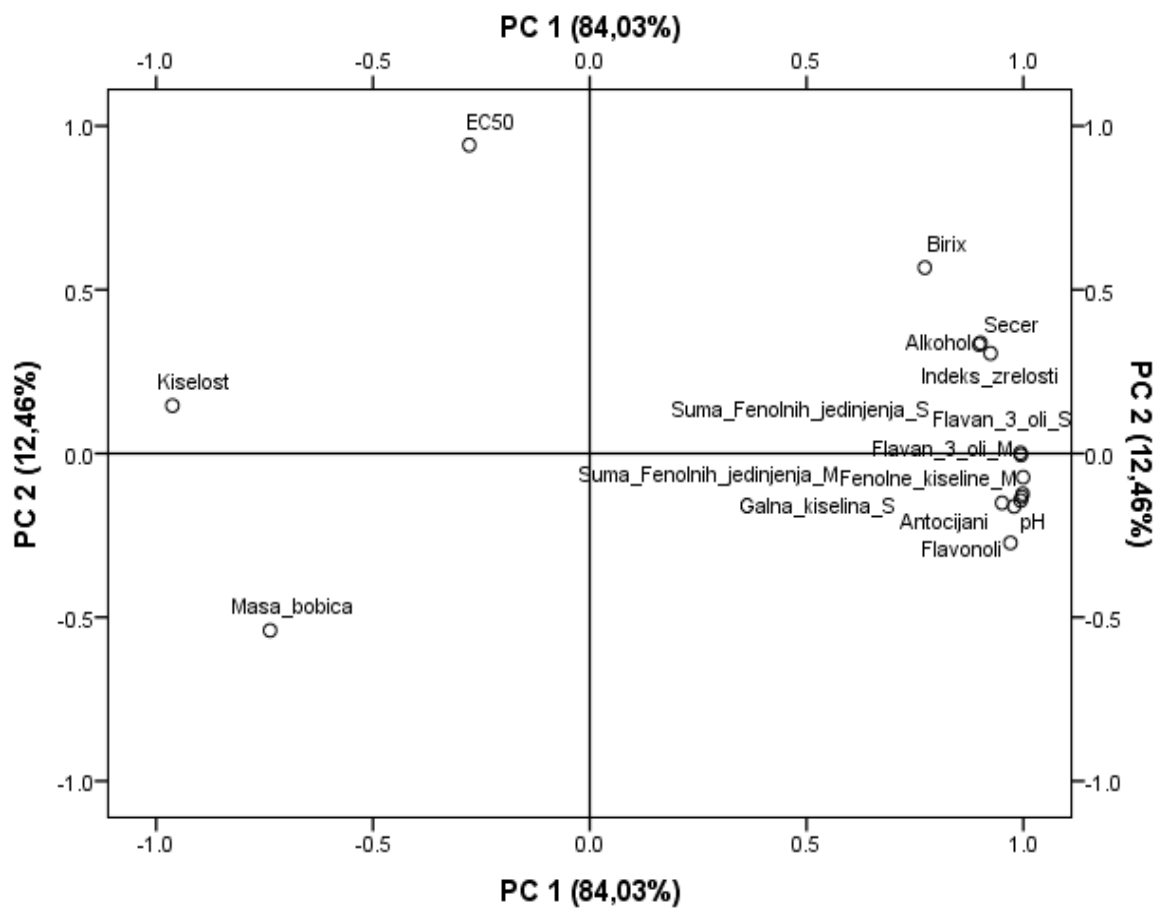
Takođe, u odnosu na PC1, uočava se razdvojenost na dve grupe. Prvoj grupi pripadaju ekstrakti obe sorte grožđa sakupljenih 2010. i 2012. godine i nalaze se na desnoj strani grafika. Drugoj grupi pripadaju ekstrakti grožđa sakupljenog 2009. i 2011. godine i nalaze se na levoj strani grafika (pozitivne i negativne vrednosti PC1, po redu javljanja).

Upoređujući ovu raspodelu (slika 4.46) sa grafikom projekcije varijabli (slika 4.47) može se zaključiti da grožđe sorte Vranac poseduje veoma dobar kvalitet, poseduje bolje fenolne karakteristike, a nešto lošija fiziološka svojstva nego grožđe sorte Merlo.

Takođe jasno se vidi razlika u kvalitetu grožđa obe sorte različitih berbi. Grožđe ubrano 2011. godine lošijeg je kvaliteta od grožđa ubranog 2009, 2010. i 2012. godine.



Slika 4.46: Raspored ekstrakata uzoraka grožđa sorti Vranac i Merlo, sakupljenih od 2009 do 2012. godine, na osnovu vrednosti glavnih komponenti PC1 i PC2



Slika 4.47: Projekcija varijabli primenjenih za karakterizaciju ekstrakata uzoraka grožđa sorti Vranac i Merlo, sakupljenih od 2009 do 2012. godine, u prostoru glavnih komponenata PC1 i PC2

4.8. ANALIZA SPOREDNIH PROIZVODA PRERADE GROŽĐA SORTE VRANAC

4.8.1.. Fenolni sadržaj ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa sorte Vranac

Prerodom grožđa u vino značajne količine fenolnih jedinjenja (rastvornih u vodi) pređu u vino, ali jedan manji deo ovih jedinjenja i dalje ostaje u otpadnom delu (komini). Proizvodnja vina generiše značajnu količinu biološkog otpada (semenke, pokožice i peteljke) koji se može iskoristiti za proizvodnju alkohola, đubriva, bio ulja i dr. U našim istraživanjima od interesa je bila fenolna karakterizacija sporednih otpadnih proizvoda grožđa Vranac, primenom spektrometrijskih metoda i HPLC analizom sa ciljem dalje njene upotrebe.

Dobijeni rezultati spektrometrijskih analiza prikazani su u tabeli 4.18.

Tabela 4.18: Fenolni sadržaj i antoksidativna aktivnost (EC_{50}) komine grožđa sorte Vranac

	Semenke iz komine	Pokožice iz komine	Peteljke	Komina
Ukupni fenoli (mg GAE/g)	113,25 ± 0,91a	61,73 ± 0,19c	73,99 ± 0,28b	67,40 ± 0,38b
Hidroksicimetne kis. (mg CAE/g)	nd	18,77 ± 0,22a	1,28 ± 0,09b	2,67 ± 0,05b
Flavonoli (mg QE/g)	nd	2,59 ± 0,06b	14,03 ± 0,15a	1,89 ± 0,02b
Ukupni antocijani (mg ME/g)	nd	36,50 ± 0,05a	nd	17,90 ± 0,04b
EC_{50} (mg/mL)	0,37 ± 0,01c	2,02 ± 0,07a	0,73 ± 0,06b	1,160 ± 0,03b

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD (n = 3); nd – nije detektovano; Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom su značajno različite (p < 0,05), analizirano Tukey-ovim testom.

Analizom ovih rezultata utvrđeno je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima semenki iz otpada u odnosu na ekstrakte iz drugih sporednih proizvoda grožđa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima za ispitivanja drugih sorti (Anastasiadi i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010; Katalinic i sar., 2010).

Sadržaj ukupnih fenola u semenkama iz otpada grožđa je 34,6% veći od ukupnog fenolnog sadržaja iz peteljki grožđa, odnosno za 40,5% nego u celoj komini i 45,5% nego u pokožici komine .

Antocijani pronađeni su samo u pokožici i celoj komini. Ukupni sadržaj antocijana u ekstraktima pokožice je za 51% veći nego u ekstraktima cele komine. Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima publikovanim od Iacopini i sar. (2008) i Katalinić i sar. (2010), gde su kvantifikovani antocijani u opsegu od 5,94 do 39,29 mg/g sbm.

Značajna količina flavonola pronađena je u ekstraktima peteljki grožđa (14,03 mg QE/g sbm), zatim u ekstraktima pokožice komine za 81,5% manja i ekstraktima komine za 86,5% manja nego u ekstraktima peteljki.

Koncentracija hidroksicimetnih kiselina pronađena u ekstraktima pokožice komine iznosi 18,77 mg CAE/g sbm i veća je poređenju sa koncentracijom hidroksicimetnih kiselina pronađena u ekstraktima cele komine za 85,7%, odnosno od ekstrakata peteljki za 93,2%.

U ekstraktima semenki nisu pronađene kiseline i flavonoli.

U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima iz sporednih proizvoda pri preradi grožđa korišćena je HPLC metoda. Dobijeni rezultati (tabela 4.19) su u saglasnosti sa onim dobijenim spektrometrijskim analizama (tabela 4.18) i literaturnim podacima (Butkhup i sar., 2010; Jordao i sar., 2012).

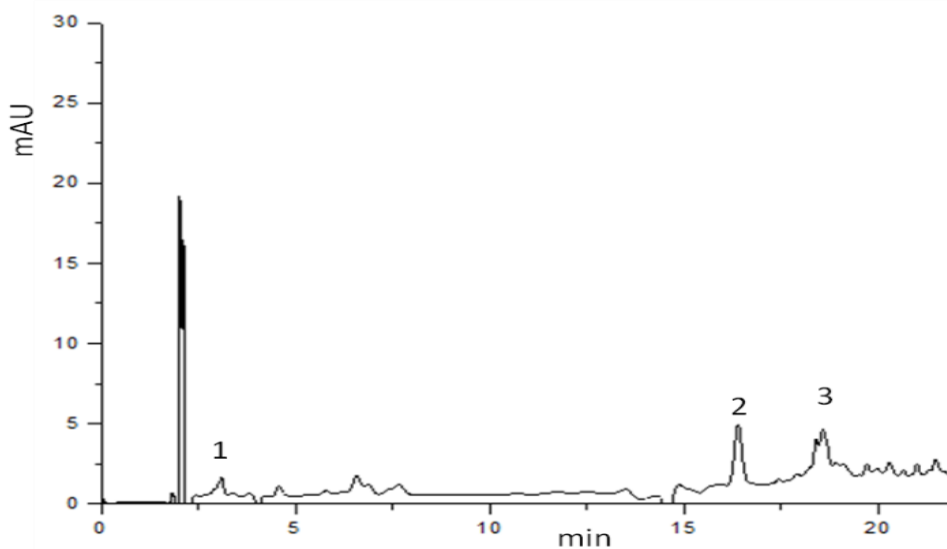
Tabela 4.19: Fenolni sastav komine grožđa sorte Vranac, određen HPLC analizom

Fenolno jedinjenje (mg/g sbm ^a)	Semenke iz komine	Pokožice iz komine	Peteljke	Cela komina
Galna kiselina	3,13 ± 0,03a	1,40 ± 0,02b	1,43 ± 0,04b	3,33 ± 0,07a
t-kutarna kiselina	nd	0,44 ± 0,10a	nd	0,41 ± 0,02a
Kafena kiselina	nd	0,38 ± 0,02a	nd	0,50 ± 0,04a
Hlorogena kiselina	nd	nd	1,45 ± 0,05	nd
p-kumarna kiselina	nd	0,81 ± 0,03	nd	nd
Kvercetin gl, ^b	nd	0,13 ± 0,01b	2,11 ± 0,03a	0,11 ± 0,01b
Rutin	nd	0,14 ± 0,01b	2,40 ± 0,07a	0,15 ± 0,01b
Luteolin gl,	nd	0,11 ± 0,02a	nd	0,06 ± 0,02b
Miricetin gl,	nd	0,08 ± 0,01	nd	nd
Kemferol gl,	nd	0,07 ± 0,01b	1,88 ± 0,04a	0,08 ± 0,01b
Kvercetin	nd	0,05 ± 0,01b	1,12 ± 0,01a	0,05 ± 0,01b
(+)-katehin	8,08 ± 0,11a	1,89 ± 0,07c	2,55 ± 0,05b	3,84 ± 0,12b
Procijanidin B2	7,60 ± 0,09a	4,71 ± 0,05b	3,60 ± 0,02b	nd
∑ ostalih procijanidina	66,00 ± 1,23a	12,10 ± 0,11c	17,40 ± 0,95b	10,46 ± 0,21c
(-)-epikatehin galat	6,40 ± 0,14a	nd	0,28 ± 0,11b	nd
(-)-epikatehin	9,64 ± 0,13a	nd	2,60 ± 0,03b	1,22 ± 0,05b
Delfinidin-3-gl.	nd	1,60 ± 0,01a	nd	1,03 ± 0,02a
Cijanidin-3- gl.	nd	1,44 ± 0,02a	nd	0,27 ± 0,01b
Petunidin-3-gl.	nd	0,58 ± 0,01b	nd	1,24 ± 0,02a
Peonidin-3-gl.	nd	2,60 ± 0,03a	nd	1,11 ± 0,01b
Malvidin-3-gl.	nd	8,57 ± 0,09a	nd	4,36 ± 0,02b

Fenolno jedinjenje (mg/g sbm ^a)	Semenke iz komine	Pokožice iz komine	Peteljke	Cela komina
Delfinidin-3-ac. ^c gl.	nd	1,55 ± 0,01a	nd	2,16 ± 0,02a
Delfinidin-3-p-kum. ^d gl.	nd	1,63 ± 0,01a	nd	2,01 ± 0,02a
Malvidin-3-ac.gl.	nd	1,87 ± 0,01a	nd	0,46 ± 0,01b
Cijanidin-3-p-kum.gl.	nd	2,11 ± 0,02a	nd	0,82 ± 0,02b
Petunidin-3-p-kum.gl.	nd	0,89 ± 0,01a	nd	0,61 ± 0,01a
Peonidin-3-p-kum.gl.	nd	2,91 ± 0,03a	nd	0,46 ± 0,02b
Malvidin-3-p-kum.gl.	nd	9,44 ± 0,09a	nd	7,15 ± 0,07a
∑ Fenolne kiseline	3,13 ± 0,03b	3,03 ± 0,03b	2,88 ± 0,03b	4,24 ± 0,09a
∑ Flavonola	nd	0,58 ± 0,02b	8,96 ± 0,05a	0,45 ± 0,04b
∑ Flavan-3-ola	97,72 ± 0,46a	18,7 ± 0,27c	56,43 ± 0,31b	15,52 ± 0,11c
∑ Antocijana	nd	35,19 ± 1,16a	nd	21,68 ± 0,13b
∑ Fenolnih jedinjenja	100,85 ± 1,71a	57,50 ± 1,13b	66,82 ± 0,14b	41,89 ± 1,43c

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3); nd – nije detektovano; ^a suva biljna masa; ^b glukozid; ^c acetil; ^d kumaroil; Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom se značajno razlikuju (p < 0,05), analizirano Tukey-ovim testom.

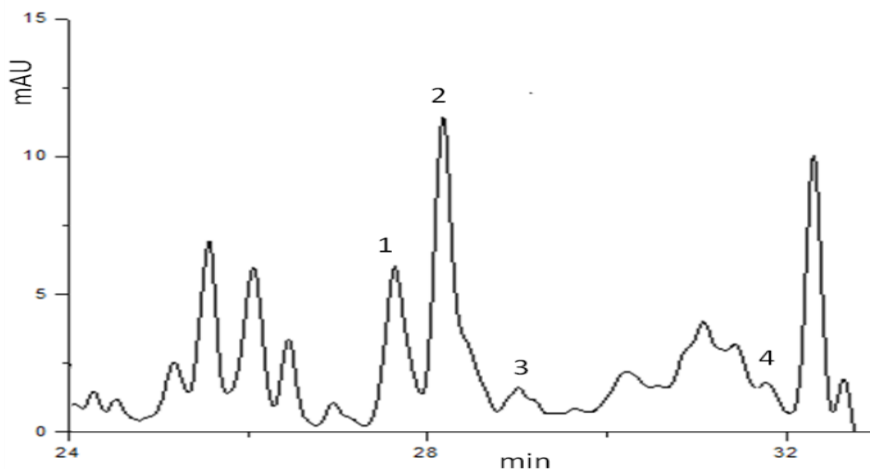
Galna kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u svim ispitivanim ekstraktima (75% više u poredjenu sa ostalim kiselinama). Ostale identifikovane fenolne kiseline bile su: *trans*-kutarna, kafena, *para*-kumarna i hlorogena kiselina, uglavnom prisutne u ekstraktima pokožice osim hlorogene kiseline koja je bila prisutna samo u ekstraktima peteljki, a *trans*-kutarna i kafena kiselina detektovane su i u komini (slika 4.48), dok je u ekstraktima semenki bila prisutna jedino galna kiselina.



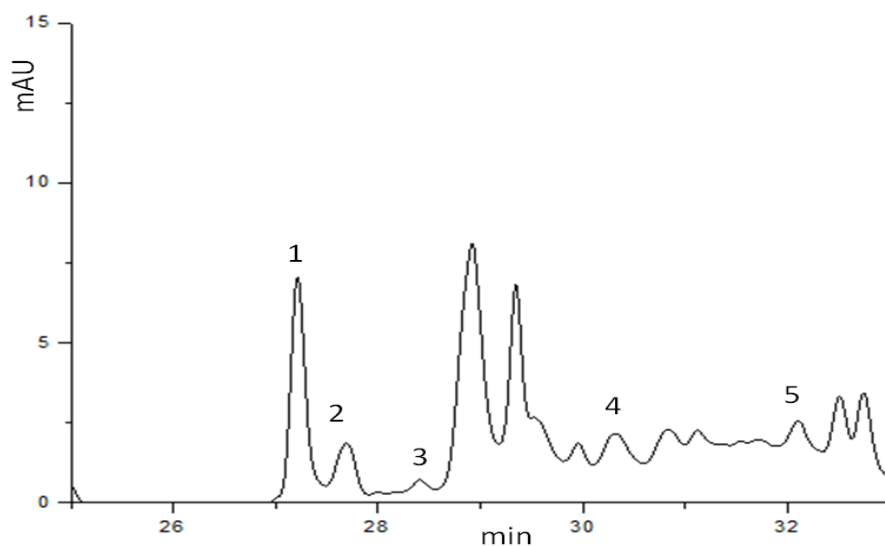
Slika 4.48: HPLC hromatogram ekstrakta komine snimljen na 320 nm:

1 galna, 2 *trans*-kutarna i 3 kafena kiselina

Najveći sadržaj flavonola pronađen je u ekstraktima peteljki (slika 4.49), zatim u pokožici i komini (slika 4.50). Njihov sadržaj u ekstraktima peteljki veći je za 93,5% i 95% nego u ekstraktima pokožice i cele komine. Kvercetin-glukozid i rutin su najzastupljeniji u ovim ekstraktima, ali takođe je utvrđeno prisustvo luteolin-glukozida, miricetin-glukozida, kemferol-glukozida i kvercetina.



Slika 4.49: HPLC hromatogram ekstrakta peteljke snimljen na 360 nm:
1 kvercetin-glukozid, *2* rutin, *3* kemferol-glukozid i *4* kvercetin

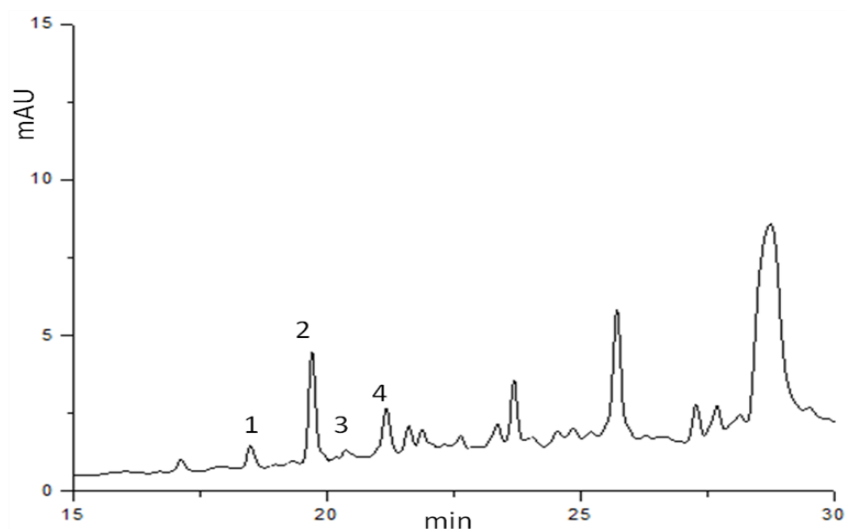


Slika 4.50: HPLC hromatogram ekstrakta komine snimljen na 360 nm:
1 kvercetin-glukozid, *2* rutin, *3* luteolin-glukozid, *4* kemferol-glukozid i *5* kvercetin

Najzastupljenija jedinjenja prisutna u ekstraktima semenki iz komine su flavan-3-olni monomeri i njihovi oligomeri. Identifikovana su tri flavan-3-olna monomera: (+)-katehin, (-)-epikatehin i (-)-epikatehin galat, jedan dimer, procijanidin B2, i veći broj oligomerna jedinjenja flavan-3-ola u svim ispitivanim ekstraktima (slike 4.51 i 4.52).

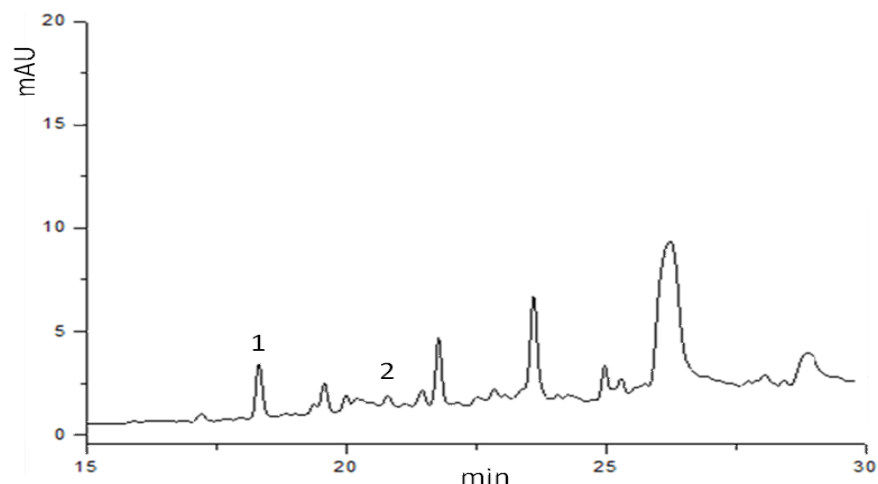
Redosled koncentracije flavan-3-ola u testiranim ekstraktima je sledeći: semenke > komine > peteljke > pokožica iz komine > cela komina.

Utvrđeno je da sadržaj ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima peteljke je manji za 42,3% nego u ekstraktima semenki, za 84,1% u ekstraktima pokožice i za 88% u ekstraktima cele komine.. Drugi autori objavili su sličnu distribuciju ovih jedinjenja u ekstraktima semenki i pokožice (Anastasiadi i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010, Souquet i sar., 2000).



Slika 4.51: HPLC hromatogram ekstrakta peteljke snimljen fluorescentnim detektorom:

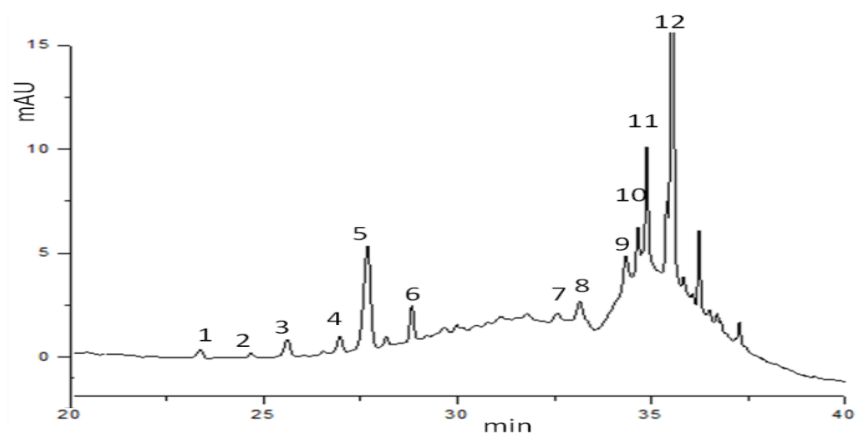
1 (+)-katehin, 2 procijanidin B2, 3 (-)-epikatehin galat i 4 (-)-epikatehin



Slika 4.52: HPLC hromatogram ekstrakta komine snimljen fluorescentnim detektorom:

1 (+)-katehin i **2** (-)-epikatehin

Analizom HPLC dijagrama utvrđeno je prisustvo antocijana u ekstraktima pokožice i cele komine (slika 4.53). Ova jedinjenja su najzastupljenija u pokožici i komini sa učešćem od 61,20 i 51,75 % od ukupnog fenolnog sadržaja ekstrakata. Malvidin-3-p-kumaroil-glukozid i malvidin-3-glukozid bili su najzastupljeniji u ekstraktima pokožice i komine, praćeni 3-glukozidnim, acetil-glukozidnim i 3-p-kumaroil-glukozidnim derivatima peonidina, delfinidina, cijanidina i petunidina.



Slika 4.53: HPLC hromatogram ekstrakta komine snimljen na 520 nm:

1 delfinidin-3-gl., **2** cijanidin-3-gl., **3** petunidin-3-gl., **4** peonidin-3-gl., **5** malvidin-3-gl., **6** delfinidin-3-ac.gl., **7** delfinidin-3-p-kum.gl., **8** malvidin-3-ac.gl., **9** cijanidin-3-p-kum.gl., **10** petunidin-3-p-kum.gl., **11** peonidin-3-p-kum.gl. i **12** malvidin-3-p-kum.gl.)

4.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa sorte Vranac

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od sporednih proizvoda pri preradi grožđa Vranac određena je DPPH testom a rezultati analiza, izraženi vrednošću EC_{50} (mg/ml) prikazani su u tabeli 4.18. Manje EC_{50} vrednosti odgovaraju jačoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Najjaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti semenki, zatim ekstrakti peteljki, komine i pokožice.

Antioksidativna aktivnost ekstrakta semenki je veća za 48% nego ekstrakta peteljki, odnosno za 68% i 81,5% nego ekstrakata komine i pokožice. Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata semenki odgovara najvećem sadržaju fenolnih jedinjenja u njima što opet ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata.

Izražena korelacija između antioksidativne aktivnosti (EC_{50}) i ukupnih fenola potvrđena je PCA (slike 4.54-4.57). Literturni podaci takođe potvrđuju jaku antioksidativnu aktivnost ekstrakata semenki i njihovu visoku korelaciju sa ukupnim fenolnim sadržajem (Butkhup i sar., 2010; Jordao i sar., 2012).

Ekstrakti peteljki grožđa takođe su pokazali veoma jaku antioksidativnu aktivnost, koja je u saglasnosti sa analizama urađenih od Spigno i De Faveri (2007).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine i pokožice u poređenju sa ostalim testiranim ekstraktima je manja što se može objasniti činjenicom da pojedina fenolna jedinjenja u ekstraktima imaju izraženiji uticaj na ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakata.

Sa slika 4.55 i 4.57 uočava se jaka korelacija između EC_{50} i flavan-3-ola, kako monomera tako i procijanidina.

Ostale klase fenolnih jedinjenja pokazale su negativnu korelaciju sa EC_{50} , odnosno imaju manji uticaj na ukupnu antioksidativnu aktivnost testiranih ekstrakata.

Ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakata je posledica sinergijskih efekta koji se javljaju između različitih jedinjenja prisutnih u testiranim ekstraktima (Butkhup i sar., 2010).

4.8.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa Vranac

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata sporednih proizvoda grožđa Vranac (komine) izražene preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidalne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.20.

Tabela 4.20: Minimalna inhibitorna/baktericidalna koncentracija - MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata komine grožđa sorte Vranac i referentnih antibiotika protivpatogenih mikroorganizma

	Ekstrakti				Antibiotici	
	Semenke	Popokožice	Peteljke	Cela komina	Streptomycin	Hloramfenikol
Gram-pozitivni sojevi						
<i>Clostridium perfringens</i>	16/16b	125/250c	16/16b	250/500c	nt	1/8a
<i>Bacillus cereus</i>	16/63b	125/125c	16/63b	125/250c	nt	8/8a
<i>Staphylococcus aureus</i>	8/16a	63/125c	16/31b	125/125d	nt	2/16a
<i>Listeria monocytogenes</i>	8/16a	31/63c	16/31b	63/125d	nt	8/18a
<i>Sarcina Lutea</i>	8/8b	63/125d	16/16c	63/125d	nt	0,5/2a
<i>Micrococcus flavus</i>	31/63b	125/250c	31/63b	250/500d	nt	1/1a
Gram-negativni sojevi						
<i>Escherichia coli</i>	63/125b	187/375d	125/250c	250/500e	16/16a	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16/63b	94/187d	31/125c	125/250e	8/8a	nt
<i>Salmonella enteritidis</i>	63/63b	94/187c	63/125b	125/250d	4/4a	nt
<i>Shigella sonnei</i>	63/187c	63/187c	16/31b	125/187d	16/16a	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31/31a	125/250c	63/63b	250/375d	nt	nt
<i>Proteus vulgaris</i>	63/187c	63/187c	16/31b	125/187d	16/16a	nt
Fungalni mikroorganizam						
<i>Candida albicans</i>	31/63b	250/500d	125/250c	500/750e	nt	16/16a

nt – nije testirano; Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom se značajno razlikuju ($p < 0,05$), analizirano Tukey testom.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da su ekstrakti semenke iz komine pokazali najjaču antimikrobnu aktivnost, pa zatim slede ekstrakti peteljki, pokožice i cele komine protiv većine testiranih mikroorganizama.

Butkhup i sar. (2010) takođe su utvrdili jaču antimikrobnu aktivnost ekstrakata semenki u odnosu na ekstrakte pokožice i cele komine. Antimikrobnu aktivnost ekstrakata semenki, pokožice, peteljke i komine protiv gram-pozitivnih, gram-negativnih bakterijskih sojeva i fungalnih sojeva su objavili i drugi autori (Jayaprakasha i sar. 2003; Ozkan i sar. 2004; Anastasiadi i sar. 2009).

Antimikrobna aktivnost testiranih ekstrakata može se povezati sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja u njima. Ekstrakti semenki imaju najveći sadržaj ukupnih fenola i pokazali su najjaču antimikrobnu aktivnost. Ovo ukazuje na postojanje korelacije između antimikrobne aktivnosti testiranih ekstrakata i sadržaja fenolnih jedinjenja u njima, o kojoj su izvestili i drugi autori (Anastasiadi i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010).

Iz tabele 4.20 može se takođe zaključiti da su gram-pozitivni sojevi osetljiviji na testirane ekstrakte (kod *Sarcina lutea* MIC/MBC vrednosti su bile u opsegu od 8/8 do 63/125 µg/mL) u odnosu na gram-negativne sojeve (kod *Escherichia coli* MIC/MBC vrednosti bile su u opsegu od 63/125 do 250/500 µg/mL) i kandidu, što je u saglasnosti sa literturnim podacima (Jayaprakasha i sar., 2003; Anastasiadi i sar., 2009).

4.8.4. Usporedna korelaciona analiza fenolnog sadržaja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata sporednih proizvoda prerade grožđa Vranac

Na osnovu podataka iz tabela 4.18-4.20 izvršena je analiza glavnih komponenti (PCA). Upotrebljeni su 47 parametara kvaliteta ispitivanih ekstrakata: fenolna jedinjenja pojedinačno i kumulativno za pojedine klase, EC₅₀ i MIC za testirane mikrobne vrste.

Primenom PCA dobijene su tri glavne komponente koje objašnjavaju oko 99,60% ukupnog varijabiliteta. PC 1, PC 2 i PC 3 doprinose 63,84%, 19,52% i 16,24% u ukupnom varijabilitetu, po redu javljanja. Činjenica da se skup od 47 originalnih varijabli redukovao na tri glavne komponente potvrđuje visok stepen korelacije između originalnih varijabli.

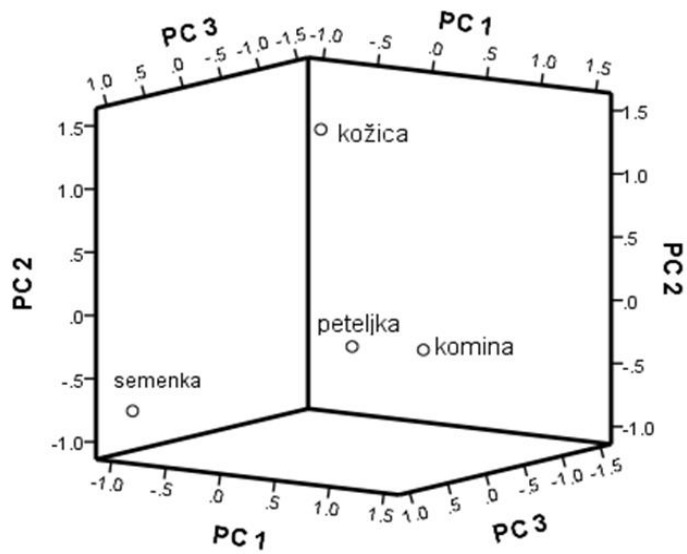
PCA je dala grafički prikaz rasporeda testiranih ekstrakata i projekcije varijabli primenjenih za karakterizaciju ekstrakata i to trodimenzionalni 3-D na osnovu PC 1, PC 2 i PC 3

(slike 4.54 i 4.55) i planarni 2-D na osnovu PC 1 i PC 2 (slike 4.56 i 4.57). Oba načina prikazuju dobro razdvajanje ekstrakata komine i njenih sastavnih delova (semenke, pokožice i peteljke) grožđa sorte Vranac, ali zbog činjenice da zajedno objašnjavaju oko 83,36% ukupnog varijabiliteta, za dalju interpretaciju rezultata koristiće se PC 1 i PC 2, grafički predstavljene na slikama 4.56 i 4.57.

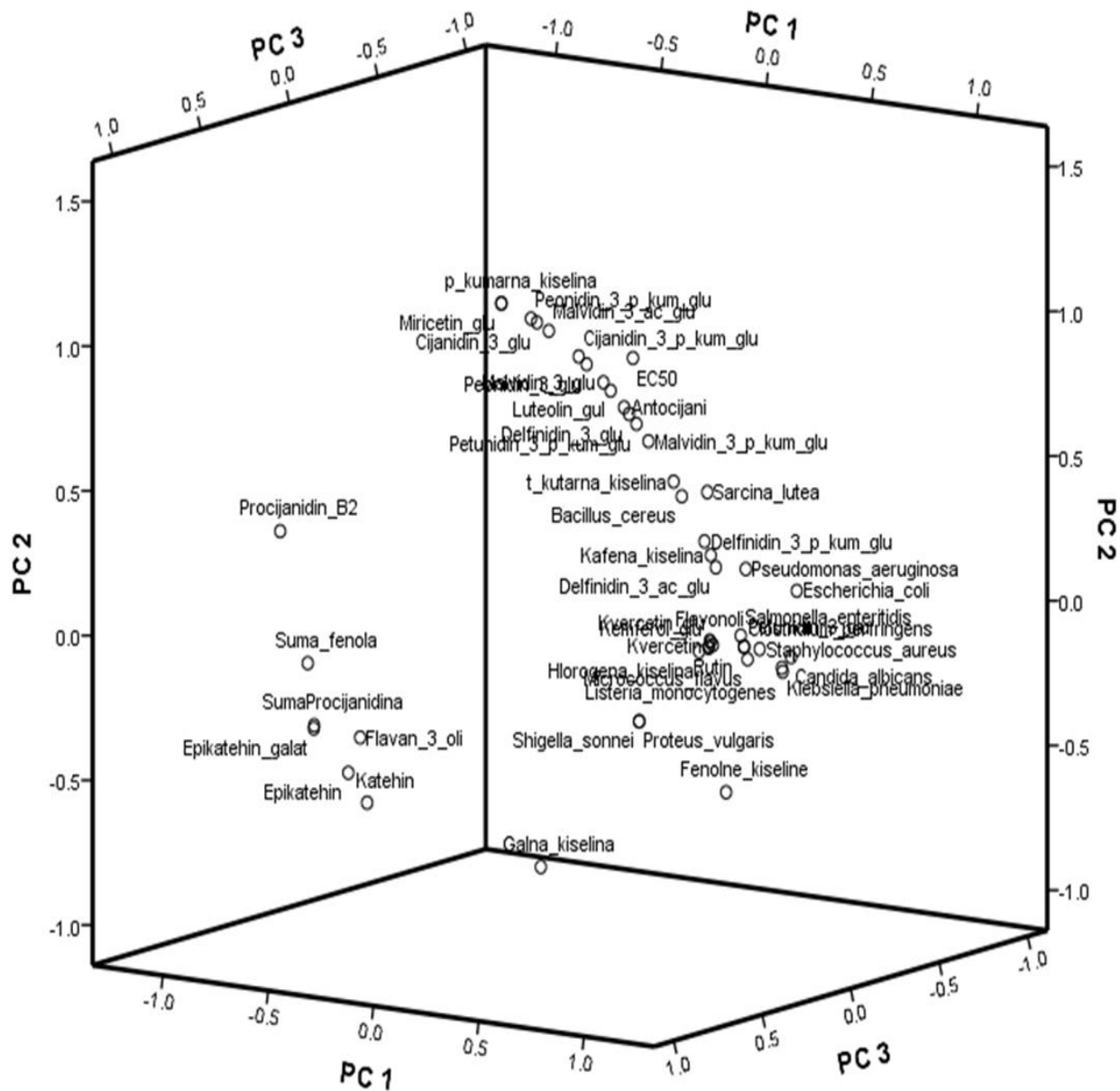
Analizom PCA grafika može se primetiti jasna razdvojenost između testiranih ekstrakata (slika 4.56): ekstrakti semenki i peteljki locirani su na levoj strani grafika, a ekstrakti pokožice i komine na desnoj strani grafika (negativne i pozitivne vrednosti PC 1, po redu javljanja). Ove dve grupe dalje su podeljene: ekstrakti komine locirani su u donjem delu grafika, a ekstrakti peteljki u gornjem delu grafika (negativne i pozitivne vrednosti PC 2, po redu javljanja), dok su ekstrakti semenki i pokožice između, sa blagim pozitivnim i negativnim opterećenjem.

Kako su ekstrakti objašnjeni grafikom rasporeda (slika 4.56), grafik projekcije varijabli (slika 4.57) analiziran je sa ciljem da se pokaže koje varijable su uticale na razdvajanje grupa. Ekstrakti semenki okarakterisani su maksimalnim sadržajem ukupnih fenola i flavan-3-ola, a peteljke flavonolnim sadržajem. Ekstrakti pokožice okarakterisani su većom vrednošću EC_{50} (slabija antioksidativna aktivnost), ali takođe i većim sadržajem fenolnih kiselina i antocijana. Ekstrakti komine pokazali su veće vrednosti MIC-a (slabija antimikrobna aktivnost).

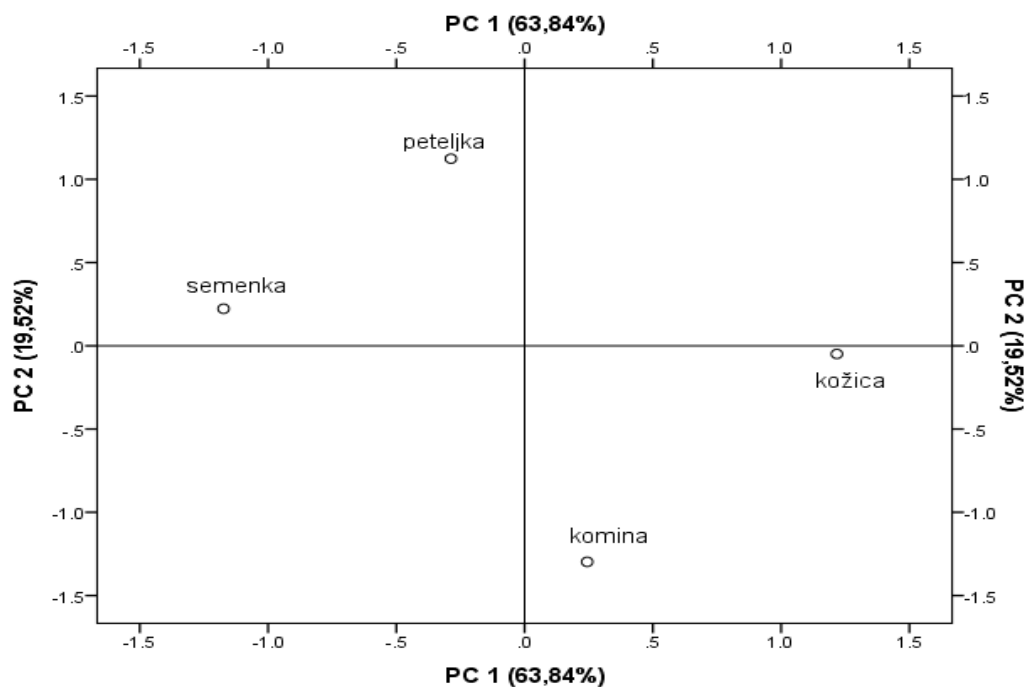
Grafik projekcije varijabli (slike 4.55 i 4.57) isto tako objašnjava odnose između originalnih varijabli. Tako flavan-3-oli pokazuju jaku korelaciju sa EC_{50} , a zajedno sa flavanolima jaku korelaciju sa antimikrobnom aktivnošću (niske vrednosti MIC-a). Antocijani i fenolne kiseline pokazuju slabu korelaciju sa EC_{50} , a fenolne kiseline i slabu korelaciju sa antimikrobnom aktivnošću ekstrakata (više vrednosti MIC-a).



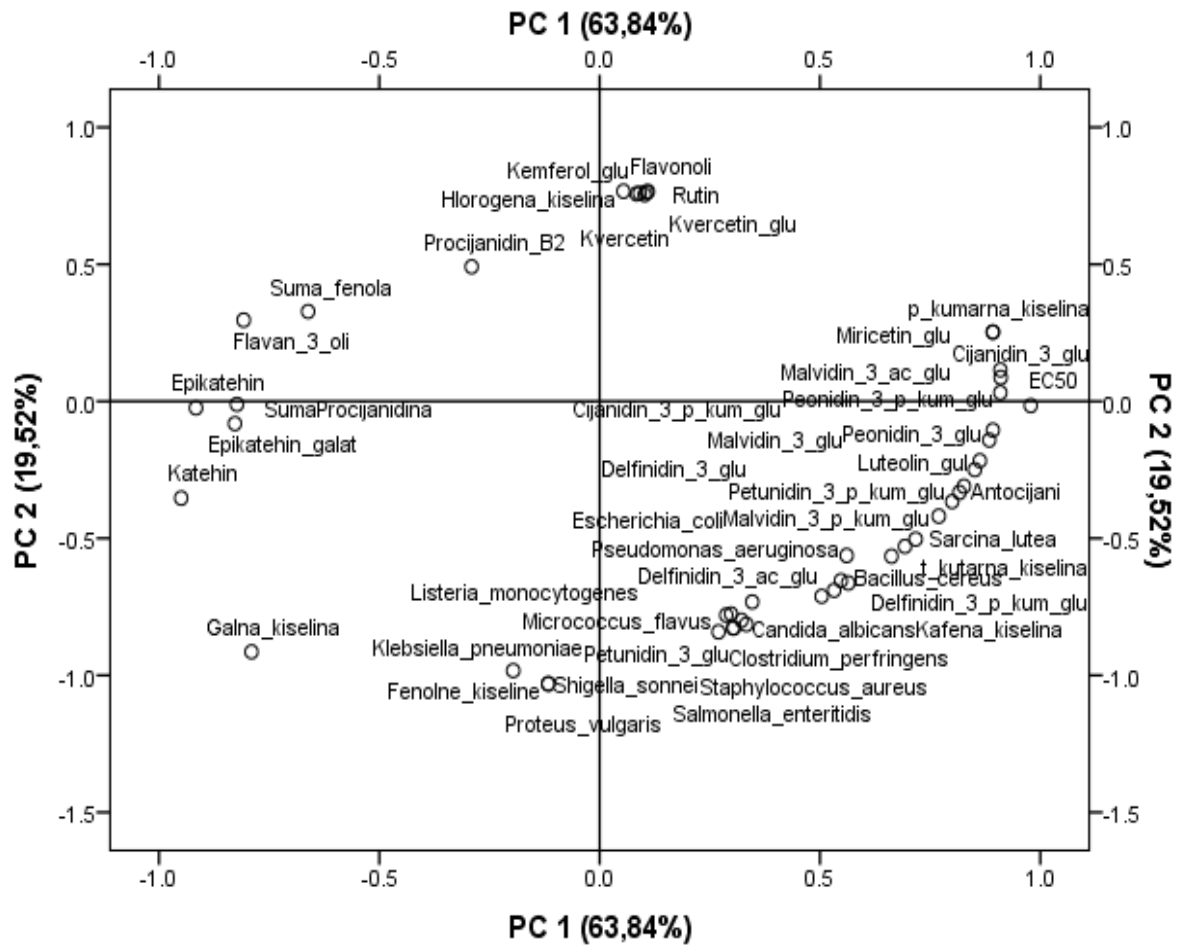
Slika 4.54: 3-D raspored ekstrakata komine i njenih sastavnih delova (semenke, pokožice i peteljke) grožđa sorte Vranac na osnovu vrednosti glavnih komponenti PC1, PC2 i PC3



Slika 4.55: 3-D projekcija varijabli primenjenih za karakterizaciju ekstrakata komine i njenih sastavnih delova (semenke, pokožice i peteljke) grožđa sorte Vranac u prostoru glavnih komponenata PC1, PC2 i PC3



Slika 4.56: Raspored ekstrakata komine i njenih sestavnih delova (semenke, pokožice i peteljke) grožđa sorte Vranac na osnovu vrednosti glavnih komponenti PC1 i PC2



Slika 4.57: Projekcija varijabli primenjenih za karakterizaciju ekstrakata komine i njenih sastavnih delova (semenke, pokožice i peteljke) grožđa sorte Vranac u prostoru glavnih komponenata PC1 i PC2

4.9. ISPITIVANJE UTICAJA INFEKCIJE LISTA PLAMENJAČOM (*Plasmopara Viticola*) NA FENOLNI SASTAV, ANTIOKSIDATIVNU I ANTIMIKROBNU AKTIVNOST EKSTRAKATA LISTA VINOVE LOZE SORTI VRANAC I MERLO

Poznato je da ultraljubičasto zračenje i razne infekcije izazvane fungalnim mikroorganizmima mogu da aktiviraju sintezu fitoaleksina u biljci (Pezet i sar., 2003), koji imaju značajnu ulogu za zdravlje ljudi jer pokazuju antioksidativna svojstva (Mikstacka i sar., 2010), kardizaštitnu aktivnost (Stiaccini i sar., 2012) i antimikrobnu aktivnost (Sun i sar., 2006). Neki autori tvrde da se ova jedinjenja sintetizuju u biljci samo u uslovima stresa, a da su odsutna, ili prisutna u tragovima, u zdravoj vinovoj lozi (Sun i sar., 2006; Pezet i sar., 2003).

Lišće vinove loze je takođe korišćeno u narodnoj medicini za lečenje nekih bolesti organizma, kao što je na primer loša cirkulacija. (Deliorman i sar., 2009).

Deo naših istraživanja je imao za cilj da ispita uticaj infekcije plamenjačom (*Plasmopara Viticola*) lista vinove loze sorti grožđa Vranac i Merlo na njegov fenolni sastav i biohemijsko delovanje.

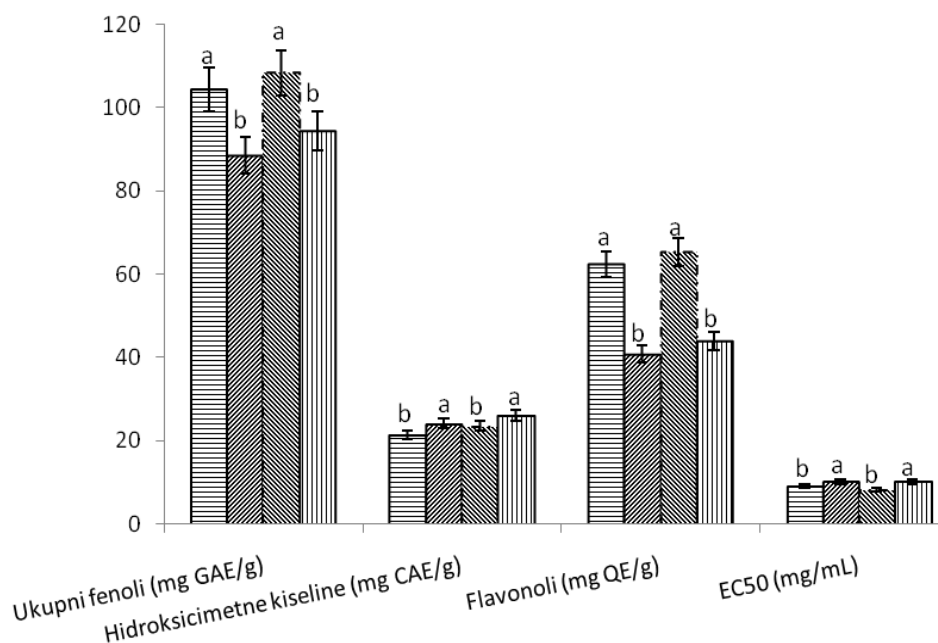
4.9.1. Fenolni sadržaj ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo

Rezultati spektrometrijskih analiza ekstrakata zdravih i inficiranih listova sorti Vranac i Merlo prikazani su u tabeli 4.21 i na slici 4.58.

Tabela 4.21: Ukupni fenolni sadržaj, sadržaj hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antioksidativna aktivnost (EC_{50}) zdravih i inficiranih ekstrakata listova sorti Vranac i Merlo

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/g)	Flavonoli (mg QE/g)	EC_{50} (mg/mL)
Vranac zdrav list	108.41 ± 8,16 ^a	23.47 ± 1,66 ^a	65.26 ± 6,10 ^a	0.139 ± 0,004 ^a
Vranac inficiran list	94.35 ± 7,34 ^a	25.97 ± 1,85 ^a	43.89 ± 3,92 ^a	0.195 ± 0,020 ^a
Merlo zdrav list	104.40 ± 7,97 ^a	21.36 ± 1,92 ^a	62.38 ± 4,24 ^a	0.163 ± 0,008 ^a
Merlo inficiran list	88.52 ± 5,62 ^a	24.1 ± 2,18 ^a	40.8 ± 5,68 ^a	0.217 ± 0,012 ^a

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3). Vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovom su značajno različite (p < 0,05), analizirano Tukey-ovim testom.



Slika 4.58: Ukupni fenolni sadržaj, sadržaj hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antioksidativna aktivnost (EC_{50}) zdravih (□ i ▨) i inficiranih (▩ i ▧) ekstrakata listova vinove loze sorti Merlo i Vranac, po redu javljanja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD ($n = 3$)

Analizom spektroskopskih rezultata utvrđeno je da je ukupni fenolni sadržaj u ekstraktima zdravih listova obe sorte Vranac i Merlo veći nego u ekstraktima inficiranih listova za 15,2% kod sorte Merlo i 12,9% kod sorte Vranac. Ekstrakti lista sorte Vranac su imali u proseku za 3,7% veći fenolni sadržaj nego ekstrakti lista sorte Merlo.

Sadržaj hidroksicimetnih kiselina je nešto drugačije raspoređen u ekstraktima lišća kod ispitivanih sorti vinove loze, i to: veći je za 11,4% kod ekstrakta zdravog lišća nego kod inficiranog lišća sorte Merlo, dok je kod sorte Vranac ovaj sadržaj bio manji za 9,62% kod ekstrakta zdravog lišća nego kod inficiranog lišća iste sorte.

Sadržaj flavonola bio je veći za 4,6% u ekstraktima lista vinove loze sorte Vranac nego u ekstraktima lista sorte Merlo. Odnos sadržaja flavonola u ekstraktima zdravih i inficiranih listova bio je u korist zdravih i to veći za 34,6% kod sorte Merlo i za 32,7% kod sorte Vranac.

Koncentracija dvadeset fenolnih jedinjenja u ekstraktima listova vinove loze sorti Vranac i Merlo dobijenih HPLC analizom prikazani su u tabeli 4.22.

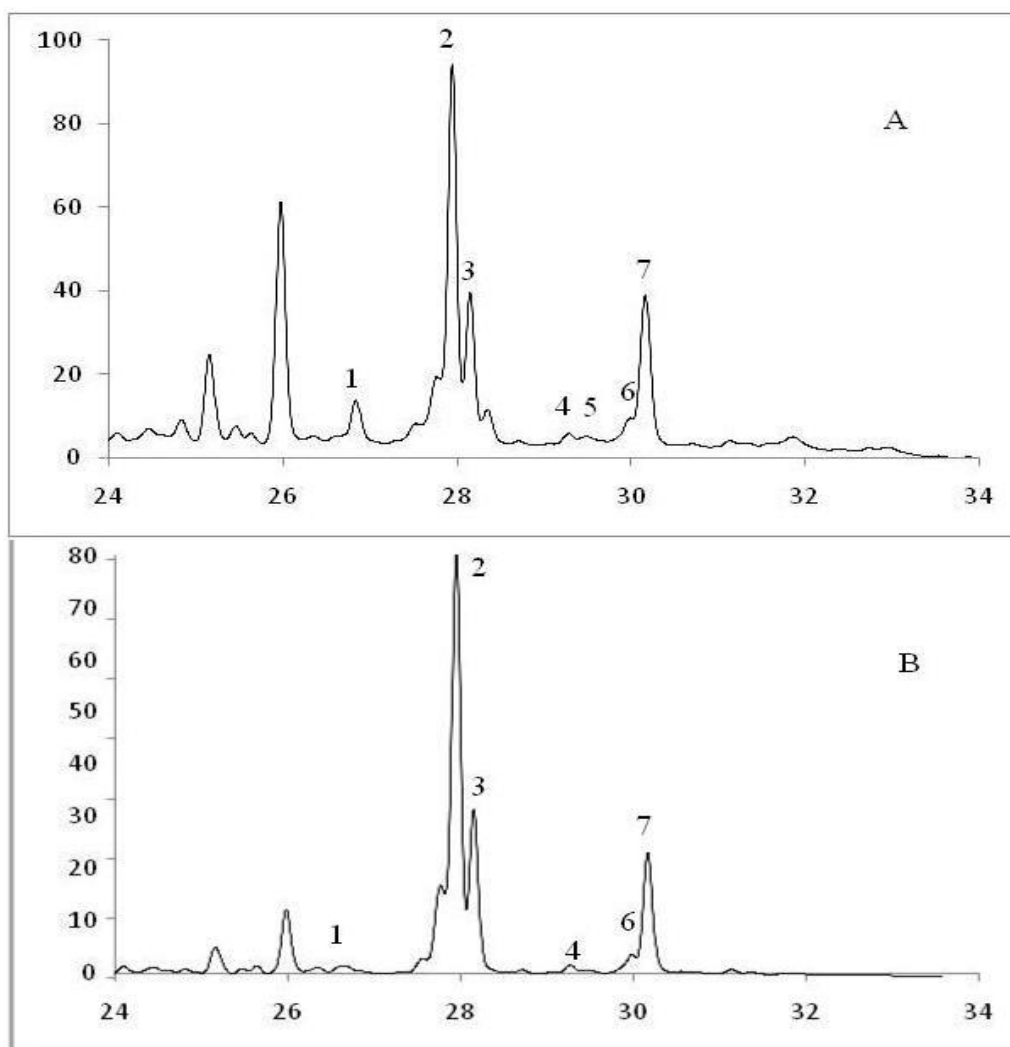
Tabela 4.22: Sadržaj fenolnih jedinjenja (mg/g) ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo, određen HPLC analizom

Fenolna jedinjenja	Vranac		Merlo	
	Zdav list	Inficiran list	Zdav list	Inficiran list
Kvercetin-galaktozid	0,603 ± 0,074 ^a	0,594 ± 0,035 ^a	0,435 ± 0,020 ^b	0,323 ± 0,040 ^b
Kvercetin-glukozid	22,61 ± 0,135 ^a	10,174 ± 0,974 ^b	20,788 ± 1,97 ^a	8,785 ± 0,842 ^b
Rutin	10,713 ± 0,218 ^a	5,129 ± 0,541 ^b	8,329 ± 0,190 ^a	4,834 ± 0,256 ^b
Luteolin-glukozid	0,676 ± 0,039 ^a	0,290 ± 0,042 ^b	0,710 ± 0,067 ^a	0,243 ± 0,047 ^b
Miricetin-glukozid	0,091 ± 0,010 ^a	nd	0,075 ± 0,006 ^a	nd
Kvercetin	1,707 ± 0,058 ^a	0,531 ± 0,062 ^b	1,447 ± 0,093 ^a	0,308 ± 0,017 ^b
Kemferol-glukozid	2,660 ± 0,030 ^a	1,560 ± 0,093 ^b	2,549 ± 0,018 ^a	1,484 ± 0,088 ^b
<i>trans</i> -kaftarna kiselina	5,788 ± 0,447 ^a	5,159 ± 0,340 ^b	5,344 ± 0,103 ^a	5,122 ± 0,940 ^b
<i>trans</i> -kutarna kiselina	0,815 ± 0,105 ^a	0,979 ± 0,045 ^a	0,575 ± 0,061 ^b	0,751 ± 0,067 ^{ab}
Kafena kiselina	0,436 ± 0,047 ^a	0,511 ± 0,014 ^a	0,253 ± 0,062 ^b	0,339 ± 0,026 ^b
Hlorogena kiselina	0,547 ± 0,032 ^b	0,640 ± 0,062 ^a	0,633 ± 0,054 ^a	0,702 ± 0,049 ^a
Ferulna kiselina	0,920 ± 0,103 ^b	1,052 ± 0,112 ^a	1,033 ± 0,029 ^a	1,160 ± 0,094 ^a
<i>trans</i> -piceid	0,113 ± 0,017 ^b	0,221 ± 0,010 ^a	0,106 ± 0,025 ^b	0,218 ± 0,078 ^a
<i>trans</i> -resveratrol	0,071 ± 0,005 ^a	0,072 ± 0,006 ^a	0,063 ± 0,007 ^b	0,060 ± 0,003 ^b
<i>cis</i> -resveratrol	nd	0,267 ± 0,031 ^a	nd	0,256 ± 0,017 ^a
<i>trans</i> - ϵ -viniferin	0,342 ± 0,054 ^b	0,407 ± 0,048 ^a	0,322 ± 0,024 ^b	0,369 ± 0,024 ^{ab}
(+)-katehin	2,541 ± 0,233 ^a	1,691 ± 0,098 ^b	2,412 ± 0,040 ^a	1,734 ± 0,154 ^b
Procijanidin B2	0,482 ± 0,097 ^{ab}	0,664 ± 0,076 ^a	0,385 ± 0,081 ^b	0,516 ± 0,040 ^a
(-)-epikatehin galat	0,088 ± 0,004 ^a	0,092 ± 0,004 ^a	0,040 ± 0,007 ^b	0,053 ± 0,007 ^b
(-)-epikatehin	1,202 ± 0,057 ^a	0,871 ± 0,071 ^b	1,164 ± 0,033 ^a	0,726 ± 0,037 ^b
∑ Flavonola	39,064 ± 3,725 ^a	18,447 ± 1,513 ^b	34,390 ± 2,105 ^a	15,981 ± 2,177 ^b
∑ Hidroksicimetnih kiselina	8,506 ± 0,864 ^a	8,341 ± 1,006 ^b	7,840 ± 0,912 ^d	8,074 ± 1,008 ^c
∑ Stilbena	0,526 ± 0,178 ^b	0,967 ± 0,306 ^a	0,491 ± 0,012 ^b	0,903 ± 0,224 ^a

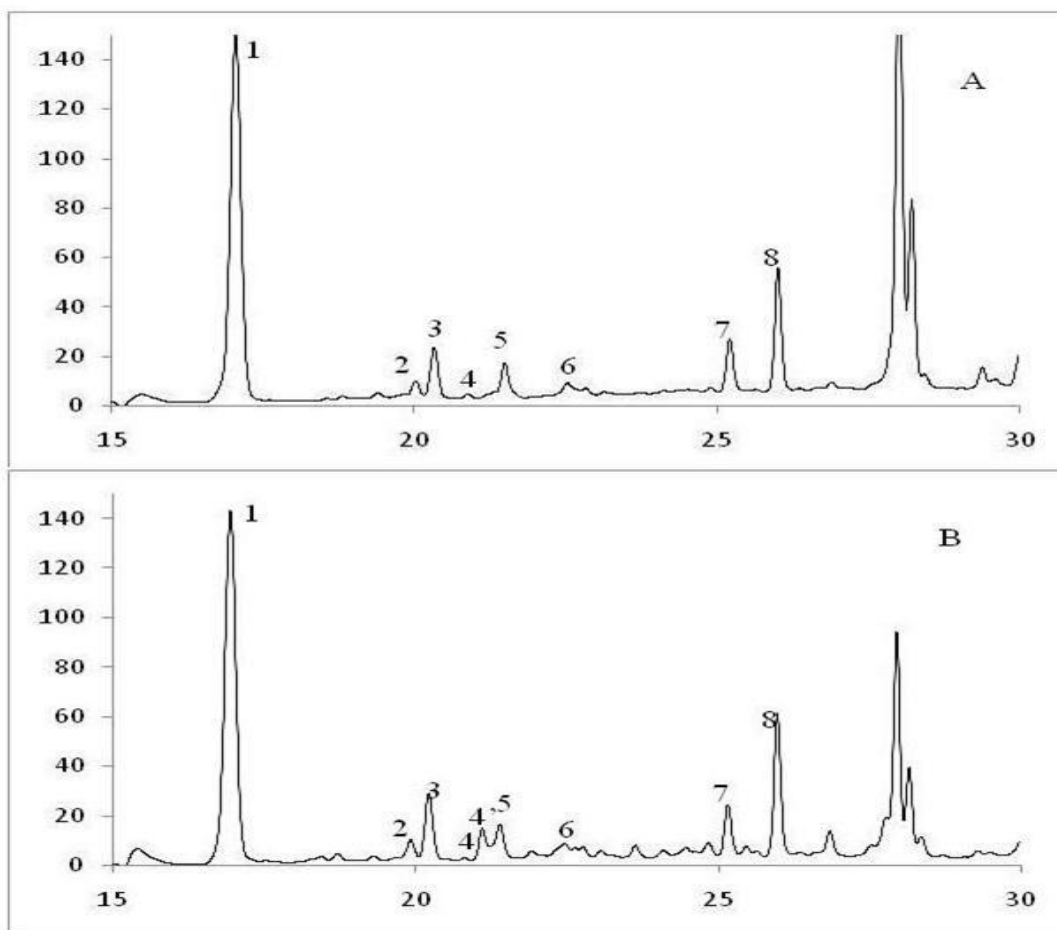
Fenolna jedinjenja	Vranac		Merlo	
	Zdav list	Inficiran list	Zdav list	Inficiran list
∑ Flavan-3-ola	4,313 ± 0,288 ^a	3,318 ± 0,316 ^b	4,001 ± 0,568 ^a	3,029 ± 0,402 ^b
∑ Fenolnih jedinjenja	52,409 ± 5,712 ^a	31,073 ± 2,948 ^b	46,722 ± 4,078 ^a	27,987 ± 3,912 ^b

Vrednosti su izražene kao srednje ± SD ($n = 3$); nd – nije detektovano; Vrednosti u istom redu sa različitim malim slovom se značajno razlikuju ($p < 0,05$), analizirano Tukey testom.

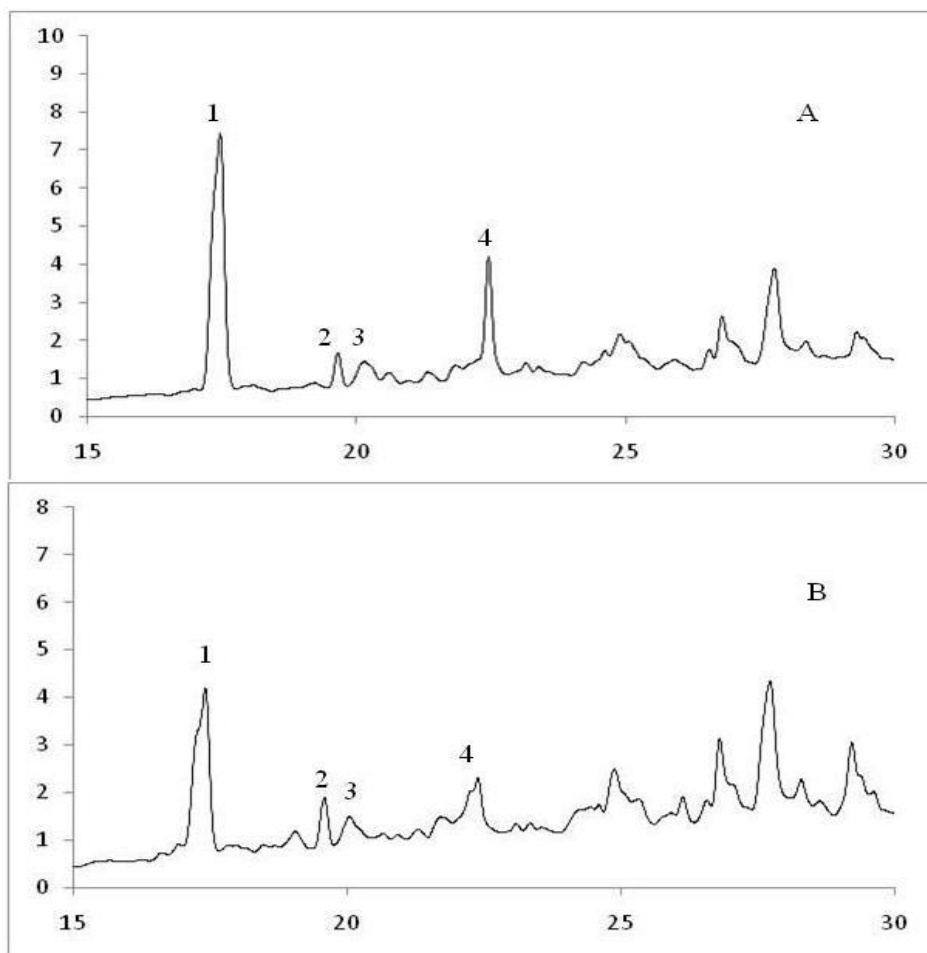
HPLC hromatogami fenolnih jedinjenja prikazani su na slikama 4.59-4.61.



Slika 4.59: HPLC hromatogram ekstrakata zdravih (A) i inficiranih (B) listova vinove loze sorte Merlo snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-galaktozid; **2** kvercetin-glukozid; **3** rutin; **4** luteolin-glukozid; **5** miricetin-glukozid; **6** kvercetin; **7** kemferol-glukozid



Slika 4.60: HPLC hromatogram ekstrakata zdravih (A) i inficiranih (B) listova vinove loze sorte Merlo snimljen na 320 nm: 1 trans-kaftarna kiselina; 2 trans-piceid; 3 trans- kutarna kiselina; 4. trans- resveratrol; 4' cis-resveratrol; 5 trans- ϵ -viniferin; 6 kafena kiselina; 7 hlorogena kiselina; 8 ferulna kiselina



Slika 4.61: HPLC hromatogram ekstrakata zdravih (A) i inficiranih (B) listova vinove loze sorte Merlo snimljen sa FLD na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1.** (+)-katehin; **2.** proantocijanidin B2; **3.** (-)-epikatehin galat; **4.** (-)-epikatehin

Najzastupljenija klasa fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima listova bili su flavonoli, pa zatim hidroksicimetne kiseline, flavan-3-oli i stilbeni. Litreaturni podaci potvrđuju sličnu distribuciju fenolnih klasa u ekstraktima listova vinove loze *Vitis Vinifera* L. (Monagas i sar., 2006; Dani i sar., 2010; Pacifico i sar., 2013).

Udeo flavonola u ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja je 73,32 i 74,64% u ekstraktima zdravih listova sorti Vranac i Merlo, dok je kod ekstrakata inficiranih listova ovaj procenat niži, 56,59 i 58,34%, po redu javljanja. Najzastupljeniji flavonol u testiranim ekstraktima bio je kvercetin-glukozid sa prosečnim udelom od 60% u odnosu na ukupne flavonole, a u određenoj

količini bili su prisutni rutin (24%), kemferol-glukozid (7,5%), kvercetin (4,5%), luteolin-glukozid (2%), kvercetin-galaktozid (1,8%) i miricetin-glukozid (0,2%) (slika 4.59).

Miricetin-glukozid nađen je samo u ekstraktima zdravih listova. Monagas i sar. (2006) identifikovali su kao najzastupljenije flavonole u ekstraktima lišća derivate kvercetina i kemferola, a Dani i sar. (2010) pronašli su rutin u visokoj koncentraciji praćen kvercetinom i kemferolom.

Sledeća klasa fenolnih jedinjenja, koja je takođe pronađena u značajnoj količini u testiranim ekstraktima, su hidroksicimetne kiseline. One su imale udeo u saržaju ukupnih fenolnih jedinjenja od 16,95 i 16,16% u ekstraktima zdravih listova sorti Merlo i Vranac, dok je u ekstraktima inficiranih listova taj udeo bio znatno veći, 29,19 i 27,52%, po redu javljanja.

Trans-kaftarna kiselina bila je najzastupljenija u testiranim ekstraktima sa prosečnim udelom u saržaju ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 68,2%, zatim je slede ferulna (13,3%), hlorogena (8%), *trans*-kutarna (7,3%) i kafena kiselina (3,2%) (slika 4.64). Pacifico i sar. (2013) identifikovali su oba izomera *cis*-kaftarnu i *trans*-kaftarnu i takođe *trans*-kutarnu kiselinu u ekstraktima listova vinove loze sorte Isabella. Fernandes i sar. (2013) pronašli su *trans*-kaftarnu i *trans*-kutarnu kiselinu, a Monagas i sar. (2006) samo *trans*-kaftarnu kiselinu u lišću vrste *Vitis vinifera L.*

Sadržaj flavan-3-ola bio je viši u ekstraktima inficiranih listova za 24,29% i 23,97% nego u ekstraktima zdravih listova vinove loze sorti Merlo i Vranac. Najzastupljeniji flavan-3-ol bio je (+)-katehin sa prosečnim udelom u saržaju ukupnih flavanolnih jedinjenja od 60%, pa zatim (-)-epikatehin (30%), procijanidin B2 (9%) i (-)-epikatehin galat (1%) (slika 4.61) što je u saglasnosti sa literturnim podacima (Dani i sar., 2010).

Ekstrakti inficiranih listova imali su za 45,60% veći sadržaj stilbena nego ekstrakti zdravih listova kod obe sorte. Dani i sar. (2010) izvestili su o značajno većoj koncentraciji resveratrola u ekstraktima listova vinove loze proizvedne po organskom načinu proizvodnje u odnosu na klasični način proizvodnje. Koncentracija stilbena u testiranim ekstraktima listova je opadala sledećim redosledom: *trans*- ϵ -viniferin > *trans*-piceid > *trans*-resveratrol, a *cis*-resveratrol pronađen je samo u ekstraktima inficiranih listova (slika 4.60). Pezet i sar. (2003) izvestili su o sličnoj distribuciji ovih jedinjenja u ekstraktima lišća, a Sun i sar. (2006) u ekstraktima pokožice nekih sorti vrste *Vitis Vinifera L.*

4.9.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo

Antioksidativna aktivnost testiranih ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo procenjena je pomoću DPPH testa. Rezultati analiza prikazani su u tabeli 4.21 i na slici 4.58, izraženi preko vrednosti EC_{50} (mg/mL). Svi ekstrakti pokazali su jaku antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti lišća vinove loze sorte Vranac pokazali su za 14,8% jaču aktivnost nego ekstrakti sorte Merlo. Takođe je zapažena razlika u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta zdravih i inficiranih listova kod obe sorte. Antioksidativna aktivnost ekstrakta zdravih listova bila je jača nego ekstrakata inficiranih listova za 25% kod sorte Merlo, odnosno za 29% kod sorte Vranac.

Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata zdravih listova odgovara visokom sadržaju fenolnih jedinjenja tih ekstrakata. Između antioksidativne aktivnosti sadržaja ukupnih fenola pronađena je visoka korelacija ($R^2 = 0,978$), ali takođe i između antioksidativne aktivnosti sadržaja flavan-3-ola i flavonola ($R^2 = 0,970$ i $0,934$, po redu javljanja), a značajno niža sa stilbenima i fenolnim kiselinama ($R^2 = 0,760$ i $0,250$, po redu javljanja).

Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata listova vinove loze kao i visoka korelacija sa ukupnim fenolnim sadržajem u tim ekstraktima potvrđena je takođe od strane drugih autora (Moangas i sar., 2006; Fernandes i sar., 2013; Pacifico i sar., 2013). Pacifico i sar. (2013) utvrdili su nizak procenat korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih kiselina u ekstraktima lišća vinove loze.

4.9.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo

Antimikrobna aktivnost, izražena preko minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Merlo i Vranac i 3 antibiotika (pozitivna kontrola) protiv 12 patogenih mikroorganizama prikazana je u tabeli 4.23 i na slici 4.62.

Metanol u testiranim koncentracijama nije pokazao aktivnost protiv ispitivanih sojeva mikroorganizama, dok su s druge strane, antibiotici (hloramfenikol, streptomycin i tetraciklin) koji su korišćeni kao pozitivna kontrola pokazali jaku antimikrobnu aktivnost (slika 4.62).

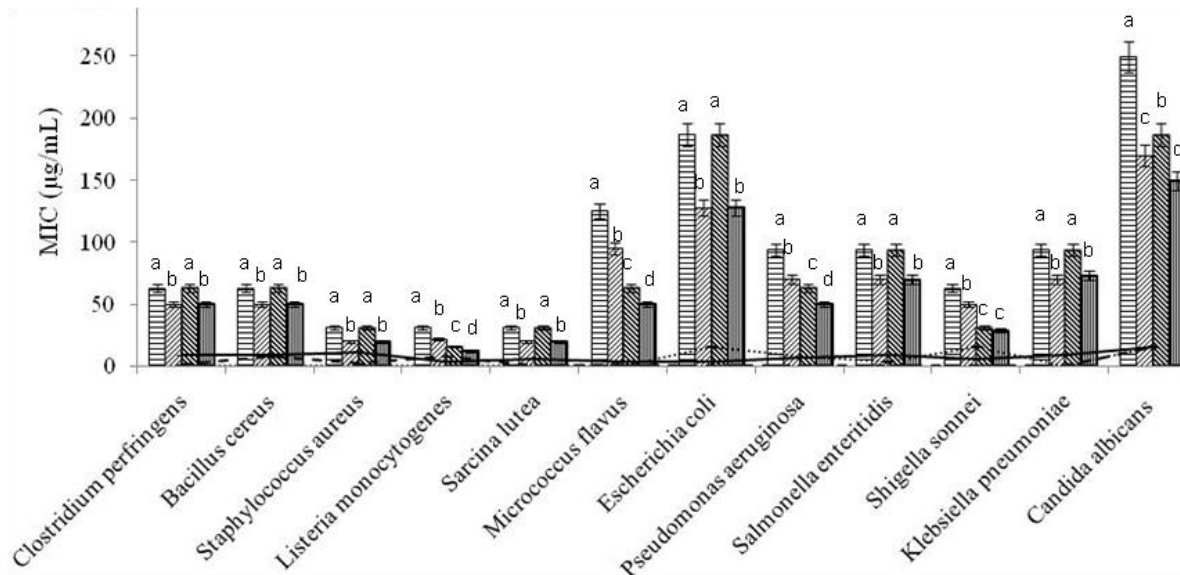
Vrednosti MIC-a za ove antibiotike bile su u opsegu od 0,5 do 18 µg/mL zavisno od testiranog soja i primenjenog antibiotika.

Ekstrakti listova obe sorte, Merlo i Vranac, pokazali su takođe jaku aktivnost ali manju nego antibiotici. Testirani ekstrakti bili su uglavnom aktivniji protiv gram-pozitivnih sojeva u odnosu na gram-negativne sojeve bakterija i kandidu. U literurnim podacima takođe se opisuju da su gram-negativni sojevi i fungalni mikroorganizmi rezistentniji na ekstrakte različitih delova grožđa (Özkan i sar., 2004; Jung i sar., 2005; Anastasiadi i sar., 2009; Orhan i sar., 2009; Yigit i sar., 2009; Butkhup i sar., 2010).

Tabela 4.23: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Merlo i Vranac i referentnih antibiotika (Streptomycin, hloramfenikol i tetraciklin) protiv Gram-pozitivnih, Gram-negativnih sojeva i kvasca

	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Merlo-zdrav	63	63	31	31	31	125	187	94	94	63	94	250
Merlo-inficiran	50	50	20	22	20	95	128	70	70	50	70	170
Vranac-zdrav	63	63	31	16	31	63	187	63	94	31	94	187
Vranac-inficiran	50	50	20	12	20	50	128	50	70	29	73	150
Streptomycin	nt	nt	nt	nt	nt	nt	16	8	4	16	0	16
Chloramphenicol	1	8	2	8	0.5	1	nt	nt	nt	nt	nt	16
Tetracyclin	9	9	12	4	6	4	3.8	7.5	9	6	9	16

Vrednosti su izražene kao srednje (n = 3). Vrednosti označeni različitim malim slovima u istoj koloni značajno su različite (p < 0.05). nt – nije testiran.



Slika 4.62: Antimikrobna aktivnost (MIC) ekstrakata zdravih (☐ i ☐) i inficiranih (▨ i ▩) listova vinove loze sorti Merlo i Vranac, po redu javljanja, i referentnih antibiotika (.....Streptomycin; -- Hloramfenikol; —Tetraciklin) protiv Gram-pozitivnih, Gram-negativnih sojeva i kvasca. Vrednosti su izražene kao srednje ± SD (n = 3). Vrednosti označene različitim malim slovima, svake mikrobne grupe, značajno su različite različite (p < 0.05)

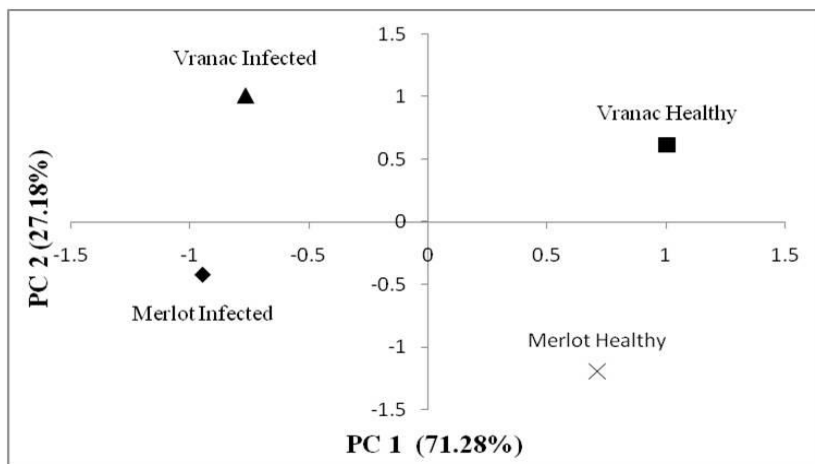
Ekstrakti listova obe sorte vinove loze nisu pokazali značajne razlike u inhibitornom delovanju protiv testiranih sojeva osim protiv sledećih vrsta: *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, i *Candida albicans*, gde su ekstrakti listova sorte Vranac pokazali značajno jaču inhibitornu aktivnost.

Sa slike 4.66 takođe se može videti da ekstrakti inficiranih listova obe sorte vinove loze pokazuju manje vrednosti MIC-a u poređenju sa ekstraktima zdravih listova. Poređenjem fenolnog sastava i vrednosti MIC-a testiranih ekstrakata može se zaključiti da stilbeni i fenolne kiseline u odnosu na druga fenolna jedinjenja daju najveći doprinos ukupnoj antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata.

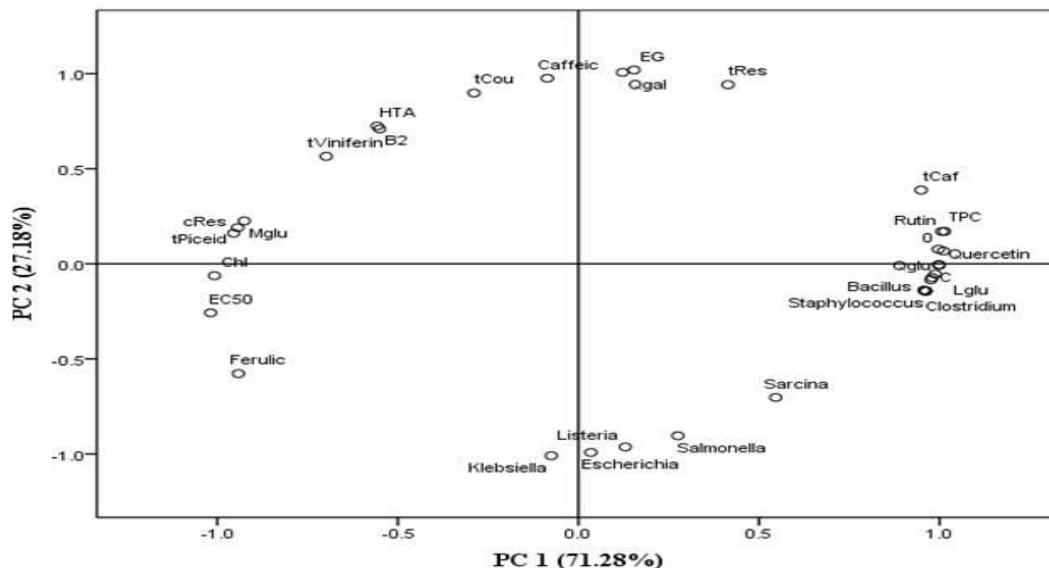
4.9.4. Usporedna korelaciona analiza fenolnog sadržaja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata zdravih i inficiranih listova vinove loze sorti Vranac i Merlo

Da bi se izvršila usporedna analiza fenolnog sadržaja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ispitivanih uzoraka vinove loze upotrebljena je analiza glavnih komponenata (PCA). Svi dobijeni podaci izvršenih analiza karakterizacije ekstrakata listova vinove loze sorti Vranac i Merlo (slike 4.58 i 4.62 i tabele 4.22 i 4.23) uzete su kao 36 varijable i statistički obrađene korišćenjem PCA. koja nam omogućava da se procene ekstrakti i fenolna jedinjenja, vrednosti MIC i EC_{50} i sveobuhvatno smanje efekti preklapanja različitih varijabli. PCA omogućuje grafički prikaz odnosa između različitih ekstrakata (slika 4.63) i varijabli (fenolna jedinjenja, vrednosti MIC i EC_{50}) (slika 4.64).

Prva glavna komponenta (PC1) ima dominantni uticaj, sa učešćem od 71,28% varijabilnosti i druga glavna komponenta (PC2) sa učešćem od 27,18% varijabilnosti, tj. zajedno, PC1 i PC2 uzimaju učešće od 98,46% od ukupnih promenljivih (varijansi). Činjenica da se skup od 36 originalnih varijabli redukovao na 2 glavne komponente potvrđuje visok stepen korelacije između originalnih varijabli.



Slika 4.63: Raspored ekstrakata listova vinove loze sorti Vranac i Merlo na osnovu vrednosti glavnih komponenti PC1 i PC2



Slika 4.64: Projekcija varijabli primenjenih za karakterizaciju ekstrakata listova vinove loze sorti Vranac i Merlo u prostoru glavnih komponenata PC1 i PC2

Analizom dobijenih grafika može se primetiti da postoji jasna odvojenost između ekstrakata inficiranih i zdravih listova vinove loze obe sorte (slika 4.63): ekstrakti inficiranih listova locirani su na levoj strani grafika a ekstrakti zdravih listova na desnoj strani grafika (negativne i pozitivne vrednosti PC1, po redu javljanja). Ove dve grupe dalje su podeljene: ekstrakti listova sorte Merlo locirani su u donjem delu grafika a ekstrakata listova sorte Vranac u gornjem delu grafika (negativne i pozitivne vrednosti PC2, po redu javljanja). Kako su ekstrakti dobro objašnjeni grafikom rasporeda (slika 4.63), grafik projekcije varijabli (slika 4.64) analiziran je sa ciljem da se pokaže koje varijable su uticale na razdvajanje grupa. Utvrđeno je da su ekstrakti inficiranih listova okarakterisani većom vrednošću EC₅₀ (slabija antioksidativna aktivnost), ali takođe i većim koncentracijama fenolnih kiselina i stilbena. Dok ekstrakte zdravih listova karakteriše veći sadržaj ukupnih fenola, flavonola i flavan-3-ola, ali takođe i veće vrednosti MIC-a (slabija antimikrobna aktivnost). Ova statistička analiza može objasniti pogodnost ovih ekstrakata u smislu sadržaja fenola kao i antioksidativnog i antimikrobnog potencijala ekstrakata. Najjača antioksidativna aktivnost i najveći sadržaj fenola dobija se iz ekstrakata zdravih listova vinove loze sorte Vranac dok je najjača antimikrobna aktivnost dobijena iz ekstrakata inficiranih listova iste sorte.

4.10. PRIMENA SPOREDNIH DELOVA GROZDA

U procesima prerade grožđa (vinifikacije) dolazi do nagomilavanja velike količine biološkog otpada (peteljke i komina). Ovako nastala biomasa, može se dalje iskoristiti u različite svrhe. Pored dobijanja ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima (opisanih u poglavlju 4.10), mogu se koristiti za proizvodnju alkohola (komovice), biodubriva, a sve više i za dobijanje bio ulja i biodizela.

4.10.1. Primena semenke grožđa i komine za dobijanje bio ulja

Primenom ekstrakcione tehnike opisane u eksperimentalnom delu dobijeno je 11,08% bio ulja iz komine i 19,78% iz semenki. Slične prinose bio ulja objavili su i drugi autori (Ohnishi i sar., 1990; Baydar i sar., 2007; Martinello i sar., 2007).

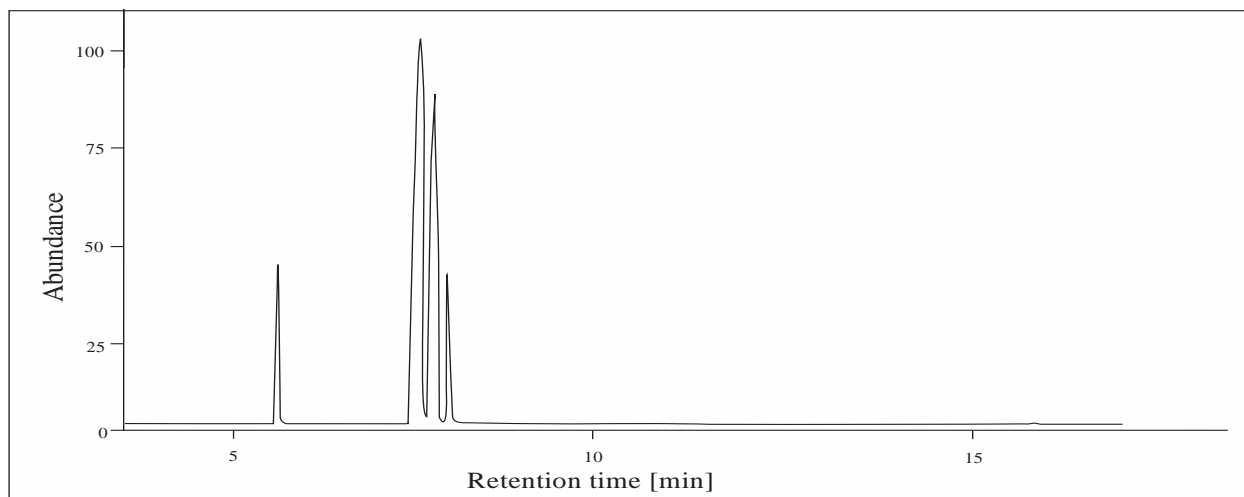
Analiza hemijskog sastava dobijenog ulja izvršena je primenom GC-MS instrumenta pod uslovima opisanim u eksperimentalnom delu. Dobijeni hromatogrami prikazani su na slikama 4.69 i 4.70.

Na osnovu analiza GC-MS hromatograma, dobijenih bio ulja utvrđen je maseni udeo (u procentima) identifikovanih masnih kiselina, koji je prikazan u tabelama 4.23 i 4.24. Utvrđeno je da su najzastupljenije masne kiseline: linoleinska, oleinska, palmitinska, stearinska, a linolna i palmitoleinska su prisutne u koncentracijama ispod 0,1%. Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim biouljima je sličan biouljima, dobijenim od suncokreta, soje, kukuruza, koja pripadaju linoleinskom tipu (Baydar i sar., 2007) .

Dobijena bio ulja su siromašna u sadržaju linolne kiseline. Poznato je da nizak sadržaj linolne kiseline u bio uljima jeste povoljan, jer linolna kiselina lako oksiduje (sadrži tri dvostruke veze na svom ugljovodoničnom lancu) i izaziva nestabilnost, tj. rok upotrebe bio ulja je kraći (Hall i sar., 1981; Mayes, 1983).

Druga po zastupljenosti masna kiselina u biouljima komine i semenki grožđa je oleinska kiselina. To je mono-nezasićena masna kiselina, koja takođe ima veliki značaj u smislu

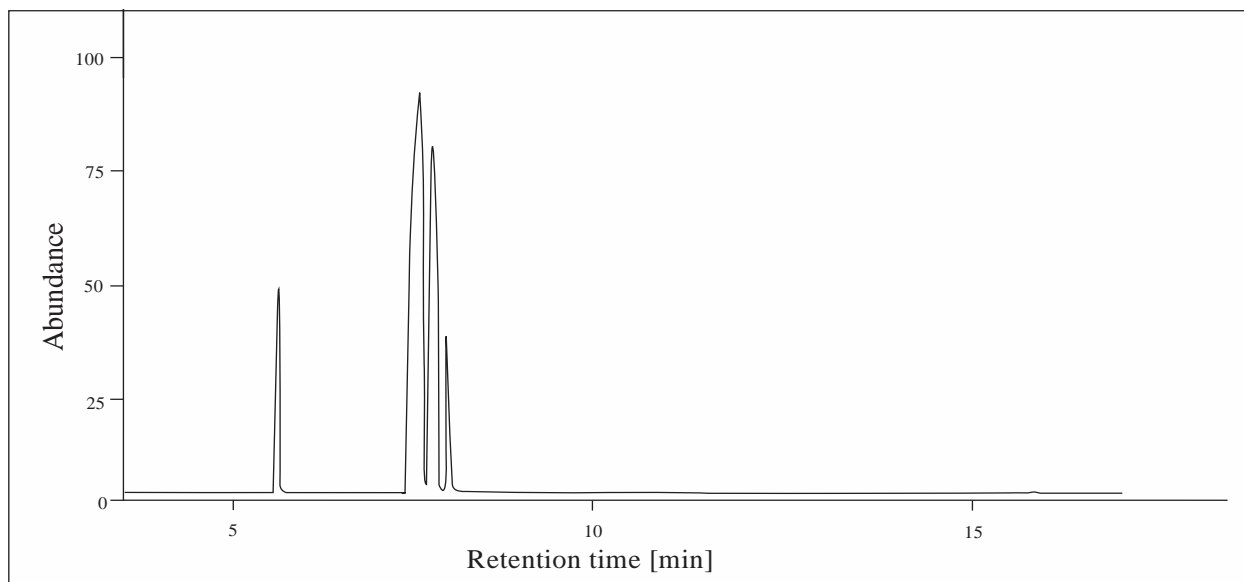
nutritivne primene ulja i uticaja na oksidativnu stabilnost ulja (Aparicio i sar., 1999). Stepen nezasićenosti ulja komine bio je preko 88%, dok je kod ulja semenki grožđa bio 86,8%. Visok procenat nezasićenosti igra važnu ulogu u snižavanju visokog nivoa holesterola u krvi, i takođe u lečenju arterioskleroze (Axtell, 1981), što ukazuje na biološko delovanje ulja dobijenog od otpadne biomase, tj. od semenki grožđa i komine.



Slika 4.65: GC-MS hromatogram bio ulja dobijenog ekstrakcijom iz semenki komine

Tabela 4.24: Hemijski sastav bio ulja dobijenog ekstrakcijom iz semenki komine

Masna kiselina	Formula	Maseni udeo (%)
Palmitinska	$C_{16}H_{32}O_2$	7,9
Linoleinska	$C_{18}H_{32}O_2$	69,9
Oleinska	$C_{18}H_{34}O_2$	17
Stearinska	$C_{18}H_{36}O_2$	4,9
Linolna	$C_{18}H_{30}O_2$	<0,1
Palmitoleinska	$C_{16}H_{30}O_2$	<0,1

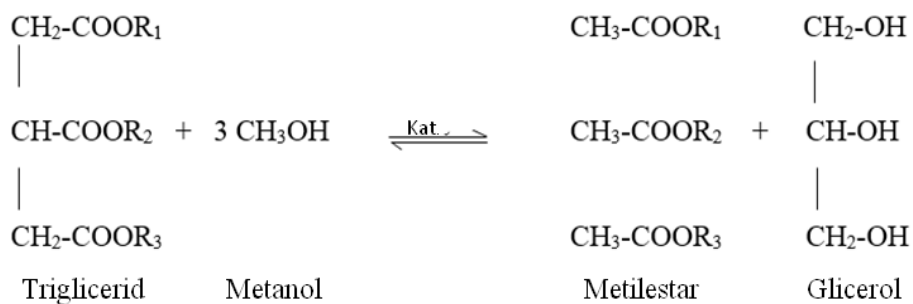


Slika 4.66: GC-MS hromatogram bio ulja dobijenog ekstrakcijom iz cele komine

Tabela 4.25: Hemijski sastav bio ulja dobijenog ekstrakcijom iz cele komine

Masna kiselina	Formula	Maseni udeo (%)
Palmitinska	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6,6
Linoleinska	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	72,4
Oleinska	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	16,3
Stearinska	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	4,1
Linolna	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	<0,1
Palmitoleinska	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	<0,1

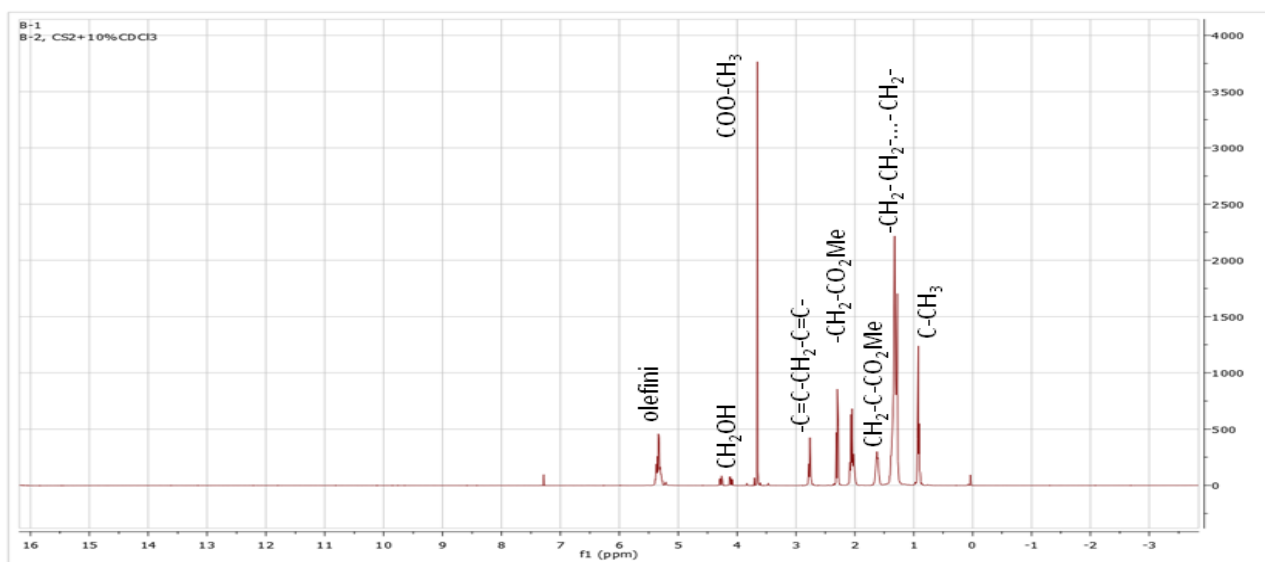
4.10.2. Primena bio ulja iz semenke grožda i komine za dobijanje biodizela



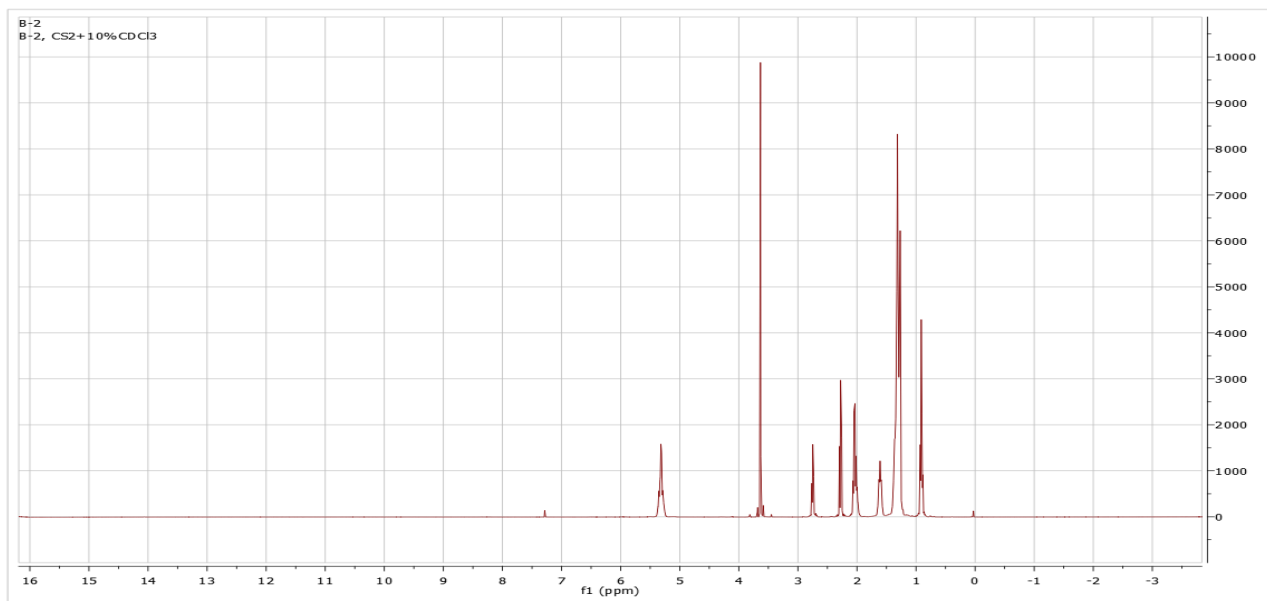
Nakon procesa transesterifikacije od bio ulja iz semenke grožđa i komine je dobijen biodizel. Karakterizacija dobijenog biodizela je izvršena primenom ^1H NMR spektroskopije pod uslovima opisanim u eksperimentalnom delu. Na osnovu analize ^1H NMR spektara (slike 4.69 – 4.72), izvršeno je određivanje prinosa nastalog biodizela.

Analiza ^1H NMR spektra ukazuje na hemijsku strukturu biodizela: terminalni metil protoni ($\text{C}-\text{CH}_3$) daju multiplet signal na δ 0,85-0,88 ppm; protoni koji daju multiplet na 1.24 i 1,30 ppm pripadaju metilenskim protonima masnokiselinskog lanca; protoni koji daju multiplet signal na δ 1,59-1,63 ppm pripadaju β -metilenskim protonima vezanih za estarsku grupu ($\text{CH}_2-\text{C}-\text{CO}_2\text{Me}$); triplet signal na δ 2.29 ppm predstavlja α -metilenske protone koji su neposredno uz estarsku grupu ($-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{Me}$); triplet na δ 2,6 - 2,8 ppm pripada bis-alilnim protonima ($-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$) kod polinezasićenog lanca; protoni koji daju singlet signal na 3,7 ppm ukazuju na prisustvo metoksi grupe formiranog biodizela, protoni koji daju singlet signal na 4,10 -4,40 ppm pripadaju protonima glicerida; multiplet na δ 5,3 ppm najverovatnije pripada olefinskim protonima. Sličnu karakterizaciju biljnih ulja publikovali su Basumatary i sar. (2013), O'Donnell i sar. (2013), Irmawati i sar. (2014).

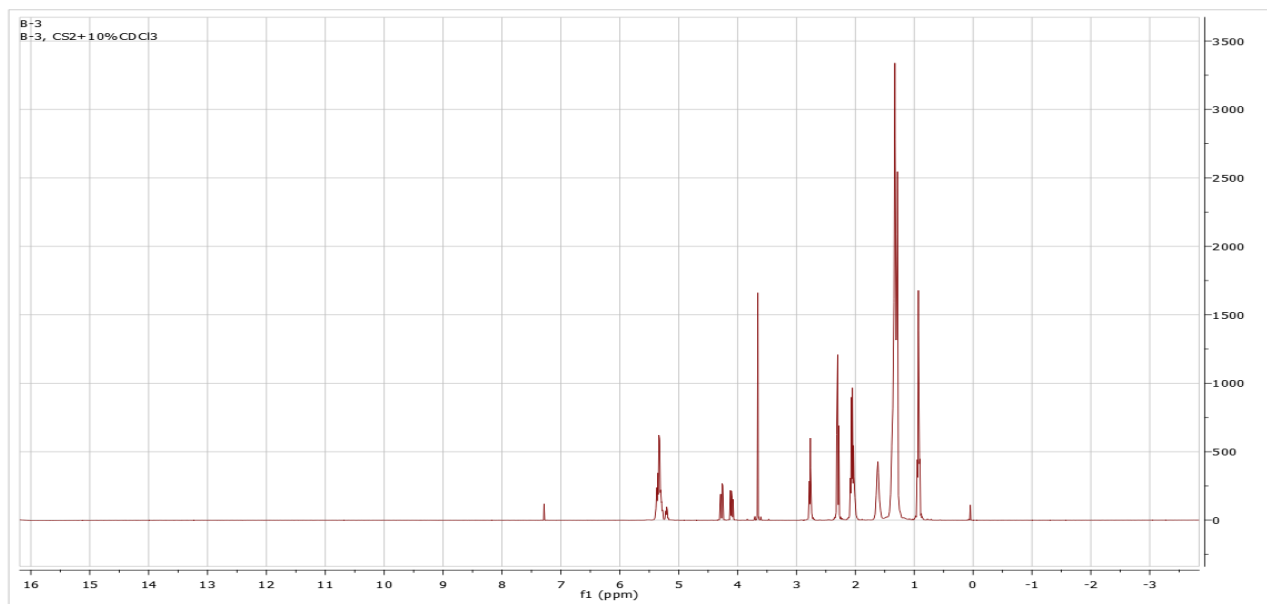
Integracione vrednosti protona iz nastale metilestarske grupe I_{ME} (δ 3.70) i integracione vrednosti pika protona glicerida I_{AG} (δ 4.10-4.40) iskorišćene su za određivanje prinosa biodizela (Knothe, 2000). Dobijeni rezultati ovih eksperimenata prikazani su u tabeli 4.26.



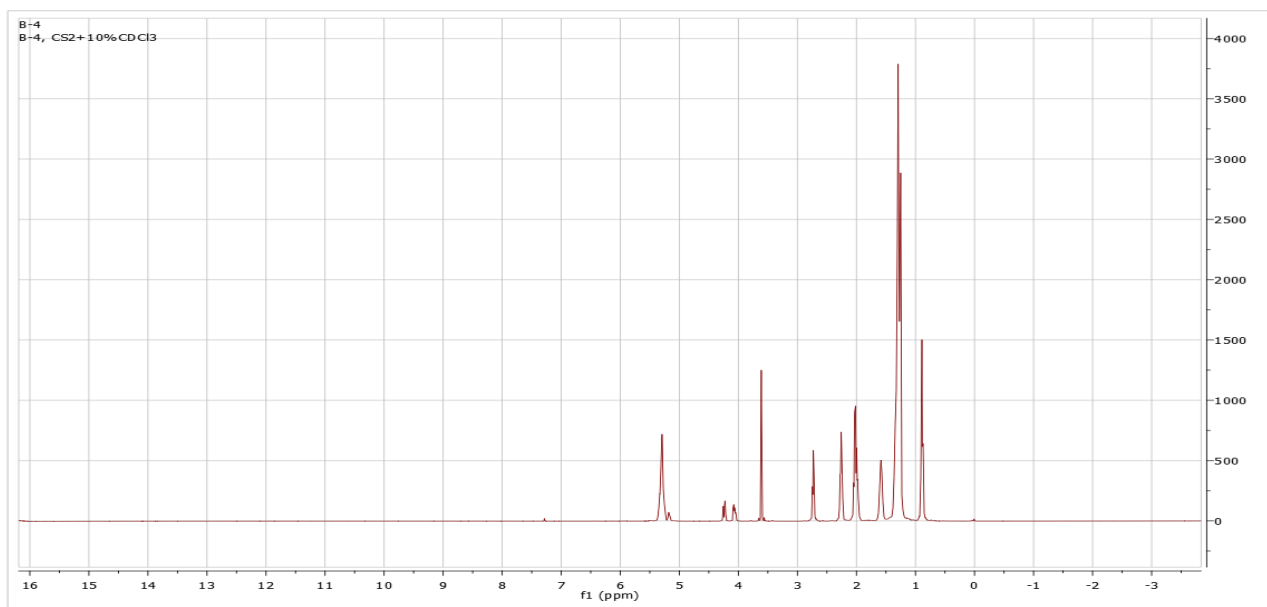
Slika 4.67: ^1H NMR spektar biodizela (BD 1) dobijenog iz ulja komine pri moljskom odnosu ulje/metanol (1:15) i temperaturi kalcinacije od 700 °C



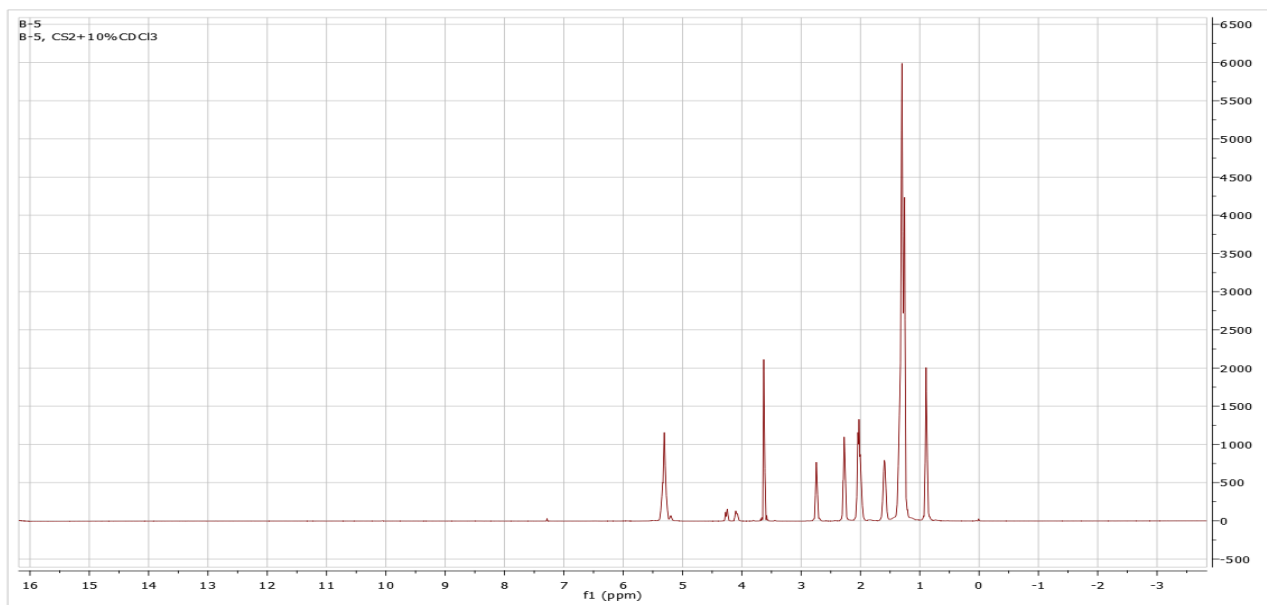
Slika 4.68: ^1H NMR spektar biodizela (BD 2) dobijenog iz ulja semenke pri molskom odnosu ulje/metanol (1:15) i temperaturi kalcinacije od 700 °C



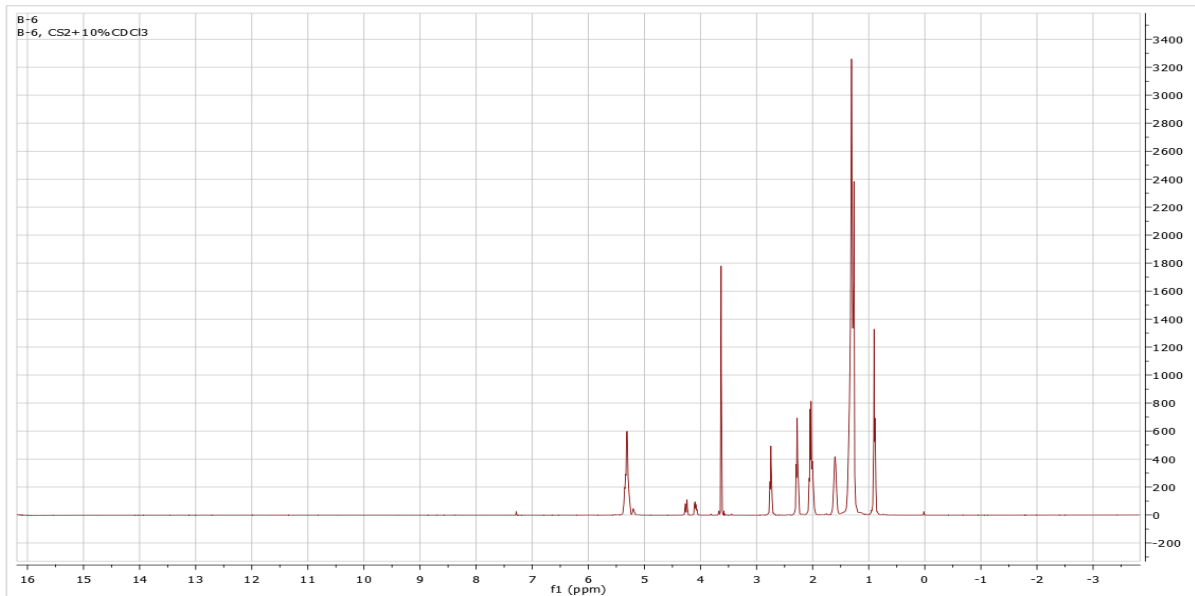
Slika 4.69: ^1H NMR spektar biodizela (BD 3) dobijenog iz ulja komine pri molskom odnosu ulje/metanol (1:15) i temperaturi kalcinacije od 900 °C



Slika 4.70: ^1H NMR spektar biodizela (BD 4) dobijenog iz ulja komine pri molskom odnosu ulje/metanol (1:12) i temperaturi kalcinacije od $700\text{ }^\circ\text{C}$



Slika 4.71: ^1H NMR spektar biodizela (BD 5) dobijenog iz ulja semenki pri molskom odnosu ulje/metanol (1:12) i temperaturi kalcinacije od $700\text{ }^\circ\text{C}$



Slika 4.72: ^1H NMR spektar biodizela (BD 6) dobijenog iz ulja semenki pri molskom odnosu ulje/metanol (1:15) i temperaturi kalcinacije od 900 °C

Tabela 4.26: Prinos bio dizela u zavisnosti od porekla uzorka, molskog odnosa ulje/metanol i temperature kalcinacije

Oznaka uzorka	Poreklo uzorka	Konverzija (%)	Molski odnos (ulje:metanol)	Temperatura kalcinacije (°C)
BD 1	Komina	74.2	1:15	700
BD 2	Semenka	100	1:15	700
BD 3	Komina	28	1:15	900
BD 4	Komina	42.5	1:12	700
BD 5	Semenka	64.4	1:12	700
BD 6	Semenka	58.7	1:15	900

Iz Tabele 4.26.se vidi da se u zavisnosti od različitih primenjenih, procesnih parametara (molarni odnos reaktanata i temperatura kalcinacije heterogenog katalizatora na bazi CaO) u reakciji transesterifikacije ulja, ekstrahovanog iz semenke komine i/ili cele komine, ostvaruju drugačiji/različiti prinosi metil-estara viših masnih kiselina (MEMK), tj. smeša od kojih će se dobiti biogorivo – biodizel.

Dobijeni rezultati pokazuju da se prinos od 100 %, apsolutna konverzija reaktanta do finalnog proizvoda – MEMK, ostvaruje kada se koristi veći molarni odnos reaktanata u korist metanola (1 : 15 = ulje iz semenke komine : metanol). Osim toga, viši prinos MEMK se ostvaruje kada se primeni niža temperatura kalcinacije (i aktivacije) CaO katalizatora (700 °C). U ranijim istraživanjima (Ljupković i sar., 2014; Vujičić i sar., 2010) je utvrđeno da katalitička aktivnost katalizatora CaO raste sa povišenjem temperature kalcinacije, te da je optimalna temperatura kalcinacije za CaO, 900 °C, što se poklapa sa rezultatima drugih autora (Kouzu i sar., 2008; Kouzu i sar., 2008b).

U ovom istraživanju je primenjen katalizator na bazi CaO kalcinisan na 700 i 900 °C, te se očekivalo da efikasnost katalizatora bude velika, što je i potvrđeno. Očigledno je da je u ovom istraživanju ostvaren veći prinos MEMK kada je upotrebljen CaO katalizator, koji je kalcinisan na nešto nižoj temperaturi (tabela 4.26), a pri primenjenom većem molarnom odnosu reaktanta, ulje iz semenke komine, u korist metanola (1 : 15), što znači da je doprinos parametra – molarni udeo reaktanta, dominantan procesni parametar, koji direktno determiniše prinos MEMK. Veći molarni odnos reaktanata kao predominantan procesni parametar određuje/utiče na viši finalni prinos MEMK, jer bitno utiče na favorizovanje smeru reakcije prema finalnom proizvodu – MEMK i glicerol. Na osnovu prethodno navedenih istraživanja Ljupkovića i sar. (2014) može se pretpostaviti da nije presudna samo baznost katalizatora, već odgovarajući balans različitih osobina CaO katalizatora, kao što su: specifična površina i porozni sistem, te prisustvo CaO aktivne kristalne faze sa kristalinitima kritičnih dimenzija, ukupna baznost, kao i dva tipa katalitički aktivnih centara, gde svi zajedno jesu neophodni za ispoljavanje optimalne katalitičke efikasnosti. U istraživanju sprovedenom u ovoj doktorskoj disertaciji, čini se da su temperature kalcinacije CaO od 700 i 900 °C, pri ostalim primenjenim procesnim parametrima kako je navedeno u eksperimentalnom delu disertacije, dovoljne da izazovu formiranje aktivne kristalne faze i aktivaciju katalitički aktivnih centara na površini..

Katalizator na bazi CaO, sa udelom CaO aktivne kristalne faze, većim od 95%, pokazao je veoma visoku katalitičku aktivnost – ostvaren prinos MEMK od 100 % u transesterifikaciji ulja iz semenke komine (Tabela 4.25) Osim navedenog, smatra se da jačina katalitički aktivnih baznih centara, kao i ukupna baznost površine katalizatora na bazi CaO, imaju veoma značajnu ulogu za ispoljenu katalitičku aktivnost u reakciji transesterifikacije ulja iz cele komine i postignut prinos MEMK od više od 74-75%.

U ovoj disertaciji na bazi literaturnih podataka postavljeni su eksperimentalni uslovi izvođenja procesa transesterifikacije (procesni parametri: viši udeo katalizatora do 10 mas.%, kao i duže vreme reakcije, do 72 h), i postignuta je apsolutna konverzija od 100%. Ovakvi uslovi izbora katalizatora, reaktanata, kao i ostalih primenjenih procesnih parametara su optimalni uslovi za primenu biomase zaostale iz prerade grožđa, tj. iz prehrambenih procesa i tehnologija obrade grožđa radi dobijanja biogoriva – biodizela na poluindustrijskom i industrijskom nivou.

Imajući u vidu masno-kiselinski sastav sirovine za transesterifikaciju, ulja iz semenke komine, kao i iz cele komine (tabele 4.24 i 4.25), kao i podatak da hemijski sastav sirovine bitno određuje kritične parametre biogoriva – biodizela, može se navesti pretpostavka o potencijalnim parametrima kvaliteta dobijenog biodizela. Hemijski sastav ulja iz semenke komine i iz cele komine veoma je sličan prema redu veličina masenih procenata udela pojedinih zasićenih i nezasićenih viših masnih kiselina sa hemijskim sastavom suncokretovog ulja. Pretpostavlja se da bi viskozitet biodizela verovatno bila smanjena u odnosu na viskoznost sirovine, zbog potencijalno blago povećanog udela mono-nezasićenih kiselina i smanjenog udela nezasićenih kiselina sa dve dvogube veze u MEMK u odnosu na sadržaj ovih kiselina u sirovini (Vujičić i sar., 2010). Takođe, pretpostavlja se da će cetanski indeks, presudni parametar kvaliteta biodizel goriva, biti neznatno niži od EU i svetskim standardima propisanih vrednosti, zbog veoma visokog sadržaja linoleinske kiseline, a naročito u slučaju ulja iz cele komine u kojem je sadržaj ove kiseline 72,4 %. Sa druge strane, za očekivati su i dobra tzv. nisko-temperaturna svojstva dobijenog biodizela zbog očekivanog značajnog udela mono-nezasićenih komponenata u smeši svih nezasićenih jedinjenja u dobijenom biogorivu, u odnosu na hemijski sastav sirovine (Vujičić i sar., 2010).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja fenolnih jedinjenja, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti različitih delova sorti vinove loze Vranac i Merlo i sporednih proizvoda koji nastaju preradom grožđa, kao i analize dobijenih biljnih ulja (ulja iz semenki i komine) i biodizela mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Fenolna jedinjenja su rasprostranjena, u različitoj koncentraciji i sastavu, u svim delovima vinove loze sorti Vranac i Merlo (list, peteljka, semenka, pokožica i pulpa), kao i u dobijenoj komini nakon prerade grožđa;
- Prinos fenolnih jedinjenja zavisi od uslova pod kojim se odvija ekstrakcija i od tipa same ekstrakcione tehnike;
- Optimalni uslovi ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz odabranih uzoraka određeni su primenom dve ekstrakcione tehnike: konvencionalna ekstrakcija – maceracija i ultrazvučna ekstrakcija;
- Najveći prinosi ekstrahovanog materijala dobijeni su korišćenjem sistem rastvarača: metanol/aceton/voda/mravlja kiselina u odnosu 30/40/29,5/0,5, što je u skladu sa različitim polarnošću i kiselosti fenolnih jedinjenja prisutnih u grožđu i njegovih sekundarnih proizvoda;
- Drugi parametri koji su značajni kod obe ekstrakcione tehnike su odnos rastvarač/biljni materijal, vreme trajanja i temperatura na kojoj se odvija proces ekstrakcije. Utvrđeno je za obe ekstrakcione tehnike da je optimalna temperatura 40 °C i optimalni odnos rastvarač/biljni materijal 58-60 mL/g . Najveća razlika između konvencionalne i ultrazvučne tehnike je u vremenu trajnja ekstrakcije i to, kod konvencionalne iznosilo je 60 min, a kod ultrazvučne 15 min, što ukazuje na prednosti primene ultrazvučne ekstrakcione tehnike;
- Najveći prinos fenolnih jedinjenja se postiže primenom ultrazvučne ekstrakcione tehnike, pri datim optimalnim uslovima, sa frekvencijom od 40 kHz i ulazna snaga ultrazvuka od 500 W;
- Ultrazvučna ekstrakcija ima prednost nad konvencionalnom ekstrakcionom tehnikom, kako zbog većeg prinosa ciljnih bioaktivnih jedinjenja, tako i zbog smanjenja unosa energije i troškova ekstrakcije. Sa druge strane, znatno kraće vreme ekstrakcije dovodi do smanjenje degradacije fenolnih jedinjenja.

- Optimalno vreme berbe, koje predstavlja kompromis između fiziološke zrelosti bobica i vremena akumulacije fenolnih jedinjenja u njima je još jedan bitan faktor za sastav i koncentraciju fenolnih jedinjenja u grožđu;
- Nutritivna i biološka vrednost grožđa, odnosno sastav i koncentracija biološki aktivnih fenolnih jedinjenja u vinovoj lozi, takođe zavise od spoljnih klimatskih uticaja (terroir-a). Utvrđeno je da je godina berbe iz 2012. bila povoljnija za sintezu fenolnih jedinjenja u poredjenju sa 2011 godinom i to koncentracija polifenola je bila veća za 14% u semenkama, za 20% u pokožici i za 5% u pulpi grožđa;
- Ispitivane vinske sorte Merlo i Vranac pokazale su dobre fiziološke osobine, kao što su: masa bobica, °Birix, procenat šećera, pH, kiselost i indeks zrelosti;
- Fenolni sadržaj grožđa zavisi i od sorte vinove loze. Utvrđeno je da sorta Vranac ima u proseku za 6% veći fenolni sadržaj u odnosu na sortu Merlo;
- U ispitivanim sortama grožđa identifikovne su različite klase fenolnih jedinjenja, kao što su: fenolne kiseline, flavan-3-oli, proantocijanidini, flavonoli, antocijani i stilbeni;
- Ispitivani ekstrakti komine, dobijeni nakon vinifikacije grožđa, pokazali su da sadrže značajnu količinu fenola (oko 40% u odnosu na grožđe);
- Ispitivani ekstrakti dobijeni iz peteljki vinove loze takođe sadrže fenolna jedinjenja, pretežno flavan-3-ole (za 60% manji nego kod semenki bobica) i flavonole (za 83% viši nego kod pokožice bobica);
- U ispitivanim ekstraktima listova vinove loze flavonoli i hidroksicimetne kiseline su dominantne fenolne klase i to, u proseku ima ih za 96% (flavonoli) i 17% (hidroksicimetne kiseline) više nego u ekstraktima pokožice bobica;
- Ekstrakti listova vinove loze inficirani plamenjačom (*Plasmopara viticola*) sadrže povećanu koncentraciju fitoaleksina – stilbena za 45,60% u poređenju sa ekstraktima zdravih listova loze;
- Svi testirani ekstrakti pokazali su jaku antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti semenke pokazali su najjaču (0,26 mg/mL), dok su ekstrakti pokožice komine imali najslabiju aktivnost (2,02 mg/mL);

- Utvrđeno je da postoji izražena korelacija između antioksidativne aktivnosti i fenolnog sadržaja ovih ekstrakata ($R^2=0,982$);
- Ustanovljena je i značajna antimikrobna aktivnost ekstrakata komine i listova vinove loze prema dvanaest bakterijskih sojeva i jednog kvasca. Gram (-) bakterija *Escherichia coli* i kvasac *Candida albicans* imaju veću rezistenciju, dok gram (+) bakterijski sojevi: *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Sarcina lutea* pokazuju najmanju rezistenciju na ispitivane ekstrakte. Ekstrakti inficiranih listova, koji imaju veći sadržaj stilbena i fenolnih kiselina pokazali su jaču antimikrobnu aktivnost;
- Sekundarni proizvodi nastali pri procesu prerade grožđa mogu se dalje primenjivati i to iz komine moguće je ekstrahovati do 11,08% bio ulja, a iz semenke grožđa do 19,78%;
- Dobijena bio ulja mogu naći primenu u ljudskoj ishrani jer je utvrđeno, primenom GC-MS analize, da sadrže nezasićene masne kiseline do 88% u ulju iz komine i do 86,8% u ulju dobijenom iz semenki komine;
- Procesom transesterifikacije izvršena je dalja transformacija bio ulja u biodizela i to 100% konverzijom, što je potvrđeno ^1H NMR analizom. Prinos metil-estara viših masnih kiselina zavisi od različitih primenjenih, procesnih parametara (molarni odnos reaktanata i temperatura kalcinacije heterogenog katalizatora na bazi CaO) u reakciji transesterifikacije ulja, ekstrahovanog iz semenke komine i/ili cele komine. Veći prinos biodizela tj. 100% konverzija se dobija kada se primeni niža temperatura kalcinacije (i aktivacije) CaO katalizatora (700 °C) i veći molarni odnos reaktanata u korist metanola (1 : 15 = ulje iz semenke komine : metanol). Drugi parameter, molarni udeo reaktanta je dominantan procesni parameter za optimizaciju procesa transesterifikacije.

Na osnovu dobijenih rezultata analize ispitivanih uzoraka može se zaključiti da su svi delovi vinove loze sorti Vranac i Merlo upotrebljivi, jer imaju pored nutritivnog i biohemijsko (antioksidativnog i antimikrobnog) delovanje na ljudsko zdravlje. Takođe, dobijeni otpadni biomaterijal nakon vinifikacije može imati dalju primenu kao bio ulje bogato nezasićenim masnim kiselinama za ljudsku ishranu ili za dalju preradu u biodizel. Naša ispitivanja potvrđuju

da vinova loza (list, peteljka, semenka, pokožica i pulpa), kao i komina može naći primenu u različitim industrijskim granama.

6. LITERATURA

Al-Farsi M.A., Lee C.Y. **2008**. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*. 108: 977-985.

Allen M. S., Lacey M. J. **1999**. "Methoxypyrazines of grapes and wines," In: *Chemistry of Wine Flavor*. A.L. Waterhouse and S.E. Ebeler Eds. American Chemical Society Washington, DC 31-38.

Allen M. S., Lacey M. J., Brown W.V., Harris R. L. N. **1989**. "Contribution of methoxypyrazines to the flavour of Cabernet Sauvignon and Sauvignon blanc grapes and wines," *Proceedings of the 7th Australian Wine Industry Technical Conference* 113-116.

Allothman M., Bhat R., Karim A.A. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia extracted with different solvents. *Food Chemistry* 115: 785-788.

Amico V., Chillemi R., Mangiafico S., Spatafora C., Tringali C. **2008**. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* 99: 5960–5966.

Anastasiadi M., Chorianopoulos N. G., George-John E. N., Haroutounian S. A. **2009**. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J. Agric. Food Chemistry* 57: 457–463.

Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A-L., Haroutounian S. A. **2010**. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts *Food Research International* 43: 805–813.

Aparicio R., Roda L., Albi M. A., Gutierrez F. **1999**. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4150-4155.

Arnous A., Makris D. P., Kefalas P. **2002**. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Compos. Anal.* 15: 655–665.

Arora A., Nair M. G., Strasburg G. M. **1998**. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 1355–1363.

Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. **2004**. Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols, and anthocyanidins via a single system employing CO₂-based fluids. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2440-2444.

Auger C., Gerain P., Laurent-Bichon F., Portet K., Bornet A., Caporiccio B., Cros G., Teissedre P., Rouanet J. M. **2004**. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5297–5302.

Auger C., Teissedre P. L., Gerain P., Lequeux N., Bornet A., Serisier S., Besançon P., Caporiccio B., Cristol J. P., Rouanet J. M. **2005**. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2015–2021.

Axtell J. D. **1981**. Breeding for improvement nutritional quality en Frey K J. (Ed.) *Plant Breeding II*, 497. The Iowa State University Press, Iowa.

Bagchi D., Sen C. K., Bagchi M., Atalay M. **2004**. Anti-angiogenic, antioxidant, and anticarcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry* 69: 75–80.

Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F. F., Casetta B. **1995**. HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2104-2109.

Balu M., Sangeetha P., Haripriya D., Panneerselvam C. **2005**. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.* 383: 295–300.

Balu M., Sangeetha P., Murali G., Panneerselvam C. **2006**. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res. Bull.*, 68: 469–473.

Basumatary S., Barua P., Chandra Deka D. 2013. Identification of chemical composition of biodiesel from *Tabernaemontana divaricata* seed oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 5(1):172-179.

Baydar N. G., Özkan G., Çetin E. S. **2007**. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas Y Aceites* 58: (1), Enero-Marzo, 29-33.

Baydar N. G., Akkurt M. **2001**. Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds. *Turk. J. Agric. For.* 25: 163-168.

Baydar N. G., Sagdic O., Ozkan G., Cetin S. **2006**. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Int. J. Food Sci.* 41: 799–804.

Benzie I. F., Strain J. J. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76.

Beveridge T. H. J., Girard B., Kopp T., Drover J. C. G. **2005**. Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1799-1804.

Bhosle B. M., Subramanian R. **2005**. New approaches in deacidification of edible oils – a review. *J. Food Engin.* 69: 481–494.

Bindon K., Myburgh P., Oberholster A., Roux K., Toit C. D. **2011**. Response of grape and wine phenolic composition in *Vitis vinifera* L. cv. Merlot to variation in grapevine water status. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32: 71-88.

Bogs J., Downey M. O., Harvey J. S., Ashton A. R., Tanner G. J., Robinson S. P. **2005**. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.* 139: 652-663.

Bogs J., Jaffé F. W., Takos A. M., Walker A. R., Robinson S. P. **2007**. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.* 143: 1347-1361.

Bohm B. A. Introduction to flavonoids, Harwood Academic Publishers, Australia, **1998**.

Bombardelli E., Morazzoni P. **1995**. *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia* 66: 291-317.

Boss P. K., Davies C., Robinson S. P. **1996**. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059-1066.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28: 25–30.

Brown J. C., Huang G., Haley-Zitlin V., Jiang X. P. 2009. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 848–852.

Bruno G., Sparapano L. **2007**. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. : V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 210–229.

Butkhup L., Chowtivannakul S., Gaensakoo R., Prathepha P., Samappito S. **2010**. Study of the phenolic composition of Shiraz red grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) cultivated in North-eastern Thailand and its antioxidant and antimicrobial activity. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31: 89-98.

Camel V. **2000**. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 19: 229-248.

Canals R., Llaudy M. C., Valls J., Canals J. M. Zamora F. **2005**. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4019-4025.

Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M., Arnao M. B. 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* 9: 196–202.

Castilla P., Echarri R., Davalos A., Cerrato F., Ortega H., Teruel J. L., Lucas M. F., Gomez-Coronado D., Ortuno J., Lasuncion M. A. **2006**. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 84: 252–262.

Cerda J. J., Normann S. J., Sullivan M. P., et al. **1994**. Inhibition of atherosclerosis by dietary pectin in microsine with sustained hypercholesterolemia. *Circulation* 89(3):1247-1253.

Cetin A., Kaynar L., Kocyigit I., Hacıoglu S. K., Saraymen R., Ozturk A., Sari I., Sagdic O. **2008**. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am. J. Chin. Med.* 36: 861–872.

Chacona M. R., Ceperuelo-Mallafrea V., Maymo-Masipa E., Mateo-Sanzb J. M., Arolac L., Guitierrez C., Fernandez-Reald J. M., Ardevolc A., Simona I., Vendrella J. **2009**. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine* 47: 137–142.

Chafer A., Pascual-Marti M. C., Salvador A., Berna A. **2005**. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *J. Sep. Sci.* 28: 2050–2056.

Chatterjee S., Poduval T. B., Tilak J. C., Devasagayam T. P. **2005**. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). *Clin. Chim. Acta* 352: 155–165.

Chavez J. H., Leal P. C., Yunes R. A., Nunes R. J. Barardi C. R., Pinto A. R., Simoes C. M., Zanetti C. R. **2006**. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet. Microbiol.* 116: 53–59.

Chevallier A. **1996**. *BLV Enzyklopedie der Heilpflanzen*, BLV, Munchen, Wien, Zurich.

Cheyrier V., Prieur C., Guyot S., Rigand, J., Moutounet, M. **1997**. The structures of tannin in grape and wines and their interactions with proteins. In: Watkins, T.R. (ed). *Wine nutritional and therapeutic benefits*. ACS Symposium Series 661, American Chemical Society, Washington DC. pp. 81 – 93.

Cheyrier V., Remy S., Fulcrand H. **2000**. “Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging.” Proceedings of the American Society of Enology and Viticulture 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, Washington, 8510-8520.

Cheyrier V., Rigaud J. **1986**. HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 248-252.

Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R., Larondelle Y. **2007**. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Trapaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology.* 55: 217-225.

Choi C. W., Kim S. C., Hwang S. S., Choi B. K., Ahn H. J., Lee M. Y., Park S. H., Kim K. **2002**. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163: 1161-1168.

Coelho E., Rocha S. M., Barros A. S., Delgadillo I., Coimbra M. A. **2007**. Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile. *Analytical Chimica Acta* 597: 257-264.

Coombe B. G., McCarthy M. G. **2000**. “Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening.” *Australian Journal of Grape & Wine Research* 6: 131-135.

Dani C., Oliboni L. S., Agostini F., Serafini C., Henriques J. A., Salvador M. **2010**. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol in Vitro* 24: 148-153.

Dani C., Oliboni L.S., Vanderlinde R., Pra D., Dias J.F., Yoneama M.L., Bonatto D., Salvador M., Henriques J.A.P. **2009**. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *J. Med. Food.* 12: 188–192.

Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T. A., Linssen P. H. **1998**. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Food Agr. Sci.* 77: 140–46.

De Bruyne T., Pieters L., Witvrouw M., de Clercq E., Berghe D. V., Vlietinck A. J. **1999**. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J. Nat. Prod.* 62: 954–958.

De Freitas V. A. P. **1995**. Recherches sur les Tanins Condensés: Application a l'Etude des Structures et Propriétés des Procyanidines du raisin et du vin. PhD Thesis. Faculty of Enology. University of Bordeaux II (France).

De Freitas V. A. P., Glories Y., Monique A. **2000**. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 397-403.

De la Hera Orts M. L., Martínez-Cutillas A., López Roca J. M., Pérez-Prieto L. J., Gómez-Plaza E. **2005**. Effect d'une irrigation déficitaire sur la teneur en anthocyanes des raisins et des vins issus du cépage Monastrell. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 39: 47-55.

Delgado R. **2004**. Changes in phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *J. Sci. Food Agric.* 84: 623-630.

Deliorman Orhan D., Orhan N., Ozcelik B., Ergun F. **2009**. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Turk J Biol.* 33: 341–348.

Dell Agli M., Galli G. V., Vrhovsek U., Mattivi F., Bosisio E. **2005**. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1960–1965.

Dimitriadis E., Williams P. J. **1984**. “The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes,” *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 66-71.

Dixon R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. **2005**. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165: 9-28.

Downey M. O., Dokoozlian N. K., Krstic M. P. **2006**. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 3: 257-268.

Downey M. O., Harvey J. S., Robinson S. P. **2003**. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 15-27.

Downey M. O., Mazza M., Krstic M. P. **2007**. Development of a stable extract for anthocyanins and flavonols from grape skin. *Am. J. Enol. Vitic.* 58(3): 358-364.

Ebeler S. E., Thorngate J. H. **2009**. Wine chemistry and flavor: Looking into the crystal glass. *J. Agric. Food Chem.* 57:8098-8108.

El-Abassy R. M., Donfack P., Materny A. **2009**. Rapid Determination of Free Fatty Acid in Extra Virgin Olive Oil by Raman Spectroscopy and Multivariate Analysis, *Journal of the American oil chemists' society* 86: 507–511.

Elshami S. M., Elmallh M. H., Mohammed S. S. **1992**. Studies on the lipid constituents of grape seeds recovered from pomace resulting from white grape processing. *Grasas Aceites* 43: 157-160.

Escribano-Bailon T., Gutierrez-Fernandez Y., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. **1992**. Characterization of Procyanidins of *Vitis vinifera* Variety Tinta del Pais Grape Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1794-1799.

Eskilsson C., Bjorklund E. **2000**. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A* 902: 227-250.

Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. **1989**. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Comm.* 6: 67-75.

Falchi M., Bertelli A., Scalzo R. L., Morassut M., Morelli R., Das S., Cui J. H., Das D. K. **2006**. Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6613–6622.

Fan P., Lou H. X. **2008**. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol. Cell Biochem.* 267: 67–74.

Faria A., Calhau C., De Freitas V., Mateus N. **2006**. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2392–2397.

Fellows P. **2000**. *Food Processing Technology: Principles and Practice*, CRC Press LLC, Boca Raton.

Fernandes F., Ramalhosa E., Pires P., Verdial J., Valentão P., Andrade P., Bento A., Pereira J. A. **2013**. *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Ind. Crop Prod.* 43: 434– 440.

Fernández C. M., Ramos M. J., Pérez Á., Rodríguez J. F. **2010**. Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource Technology* 101: 7030–7035.

Fiori L. **2007**. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: critical approach and modelling. *Journal of Supercritical Fluid* 43: 43–54.

Fossen T., Slimestad R., Ovstedal D. O., Andersen O. M. **2002**. Anthocyanins of grasses. *Biochem. System. Ecol.* 30: 855-864.

Fournand D., Vivens A., Sidhoum L., Souquet J-M., Motounet M., Cheynier V. **2006**. Accumulation and Extractability of Grape Sin Tanins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 7331-7338.

Gao M., Liu C.-Z. **2005**. Comparison of Techniques for the Extraction of Flavonoids from Cultured Cells of *Saussurea medusa* Maxim *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1461-1463.

Garcia-Alonso J., Ros G., Vidal-Guevara M. L., Periago M. J. **2006**. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr. Res.* 26: 330–339.

Ge Y., Ni Y., Yan H., Chen Y., Cai T. 2002. Optimization of the Supercritical Fluid Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ Using Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* 67: 239-243.

Giergielewicz-Mozajska H., Dabrowski L., Namienik J. **2001**. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31: 149.

God J. M., Tate P., Larcom L. L. **2007**. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *J. Med. Food.* 10: 54–59.

Goiffon J. P., Mouly P. P., Gaydo E. M. **1999**. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 382: 39-50.

González-Barreiro C., Rial-Otero R., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J. **2013**. Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi: 10.1080/10408398.2011.650336.

Greenspan M. D., Shackel K. A., Matthews M. A. **1994**. "Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits," *Plant Cell & Environment* 17: 811-820.

Guedes de Pinho P., Ferreira A. C. S., Pinto M. M., Benitez J. G., Hogg T. A. **2001**. Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5484-5488.

Hall J. L., Flower T. J., Roberts R. M. **1981**. *Plant Cell Structure and Metabolism*. Longman Inc., New York.

Hanlin R. L., Hrmova M. H., Harbertson J. F., Downey M. O. **2010**. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16: 173-188.

Hashizume K., Samuta T. **1999**. "Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration quality," *Am. J. Enol.Vitic.* 50: 194-198.

Haslam E. **1998**. *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, pp. 24-30. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Heemken O. P., Theobald N., Wenclawiak B. W. **1997**. Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, Sonication, and Methanolic Saponification Extractions for the Determination of Organic Micropollutants in Marine Particulate Matter. *Anal. Chem.* 69: 2171-2180.

Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk, A. **2007**. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology.* 54: 44-50.

Heredia F. J., Francia-Aricha E. M., Rivas-Gonzalo J. C., Vicario I. M., Santos-Buelga C. **1998**. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. pH effect. *Food Chem.* 63(4): 491-498.

Hidalgo-Togores J. **2002**. *Tratado de Enologi'a*. Madrid (Spain): Ediciones Mundi-Prensa.

Huang D., Ou B., Prior R. L. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Hudson T. S., Hartle D. K., Hursting S. D., Nunez N. P., Wang T. T. Y., Young H. A., Arany P., Green J. E. **2007**. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Res.* 67: 8396-8405.

Human M. A., Bindon K. A. **2008**. Interactive effect of ethephon and shading on the anthocyanin composition of *Vitis vinifera* L. cv. Crimson Seedless. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29: 50-58.

Iacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L. **2008**. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.* 21: 589-598.

Ivanišević D., Jakšić D., Korać N. **2015**. Vinogradarski atlas Srbije. Popis poljoprivrede 2012. Poljoprivreda u Republici Srbiji. www.popispoljoprivrede.stat.rs, www.stat.gov.rs, 416 str.

Irmawati R., Shafizah I., Nur Sharina A., Abbastabar Ahangar H., Taufiq-Yap Y. H.. **2014**. Transesterification of Palm Oil by Using Silica Loaded Potassium Carbonate (K₂CO₃/SiO₂) Catalysts to Produce Fatty Acid Methyl Esters (FAME). *Energy and Power* 4(1): 7-15.

Jayaprakasha G. K., Tamil S., Sakartah K. K. **2003**. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 36: 117–122.

Jin Z. M., He J. J., Bi H. Q., Cui X. Y., Duan C. Q. **2009**. Phenolic compound profiles in berry skin from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules* 14: 4922-4935.

Jing S. X. **1999**. Grape Classification and Germplasm Resources. In *Grape Science*, 1st ed.; He, P.C., Ed.; China Agricultural Press: Beijing, China; pp. 8–32.

Johnson H. **1989**. The story of wine, Mitchell Beazley, London.

Jordão A. M., Correia A. C., Gonçalves F. J. **2012**. Evolution of antioxidant capacity in seeds and skins during grape maturation and their association with proanthocyanidin and anthocyanin content. *Vitis* 51: 137–139.

Jung H. J., Hwang I. A., Sung W. S., Kang H., Kang B. S., Seu Y. B., Lee D. G. **2005**. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res.* 2: 557–560.

Jung K., Wallig M., Singletary K. **2006**. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett.* 233: 279–288.

Júnior D. S., Krug F. J., de Godoi Pereira M., Korn M. **2006**. Currents on ultrasound-assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination. *Applied Spectroscopy Reviews* 41: 305-321.

Katalinic V., Mozina S. S., Skroza D., Generalic I., Abramovic H., Milos M., Ljubenkovic I., Piskernik S., Pezo I., Terpinac P., Boban M. **2010**. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119: 715-723.

Kennedy J. A., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E. J., Jones G. **2001**. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5348-5355.

Kennedy J. A., Jones G. P. **2001**. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1740-1746.

Kennedy J. A., Matthews M. A., Waterhouse A. L. **2000a**. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55: 77-85.

Kennedy J. A., Matthews M. A., Waterhouse A. L. **2002**. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 268-274.

Kennedy J. A., Troup G. J., Pilbrow J. R., Hutton D. R., Hewitt D., Hunter C. A., Ristic R., Iland P. G., Jones G. P. **2000b**. "Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz." *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6: 244-254.

Kennedy JA. **2008**. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* 35(2): 77-90.

Kong Q.-S. **2004**. *Chinese Grape Germplasm*, 1st ed.; China Agricultural Sciencetech Press: Beijing, China; pp. 10–21.

Koslitz S., Renaud L., Kohler M., Wüst M. **2008**. Stereoselective formation of the varietal aroma compound rose oxide during alcoholic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1371–1375.

Kouzu M., Kasuno T., Tajika M., Sugimoto Y., Yamanaka S., Hidaka J. **2008a**. *Fuel.* 87: 2798-2806.

Kouzu M., Kasuno T., Tajika M., Yamanaka S., Hidaka J. **2008b**. *Appl. Catal. A* 334: 357-365.

Krasnow M., Weis N., Smith R. J., Benz M. J., Matthews M., Shackel K. **2009**. Inception, progression, and compositional consequences of a berry shrivel disorder. *Am. J. Enol. Vitic.* 60: 24-34.

Kulisic-Bilusic T., Schnabele K., Schmoller I., Dragovic-Uzelac V., Krisko A., Dejanovic B., Milos M., Pifat G. **2009**. Antioxidant activity versus cytotoxic and nuclear factor kappa B regulatory activities on HT-29 cells by natural fruit juices. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 417–424.

Lachman J., Šulc M., Faitová K., Pivec V. **2009**. Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *International Journal of Wine Research* 1: 101–121.

Lacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L. **2008**. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos. Anal.* 21: 589-598.

Lardos A., Kreuter M. H. **2000**. Red vine leaf. Ed. By Dr. M. H. Kreuter, and Flachsmann AG, Zurich: Switzerland: Intercity Pharmaceuticals and Extracts, pp. 1-7.

Lazze M. C., Pizzala R., Pecharroman F. J. G., Garnica P. G., Rodriguez J. M. A., Fabris N., Bianchi L. **2009**. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *J. Med. Food.* 12: 561–568.

Li H., Chen B., Nie L., Yao S. **2004**. Solvent effects on focused microwave assisted extraction of polyphenolic acids from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemical Analysis* 15: 306-312.

Li W. G., Zhang X. Y., Wu Y. J., Tian X. **2001**. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol. Sin.* 22: 1117–1120.

List P. H., et al. **1979**. *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 4. Ausg., Springer, Berlin, New York.

Liu Y. X., Pan Q. H., Yan G. L., He J. J., Duan C. Q. **2010**. Changes of flavan-3-ols with different degrees of polymerization in seeds of ‘Shiraz’, ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Marselan’ grapes after veraison. *Molecules* 15: 7763-7774.

Ljupković R., Micić R., Tomić M., Radulović N., Bojić A., Zarubica A. **2014**. *Hem. Ind.* 68 (4): 399-412.

Maier T., Schieber A., Kammerer D. R., Carle R. Residues of grape (*Vitis vinifera*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 2009, 112, 551–559.

Majo, D.D.; Guardia, M.L.; Giammanco, S.; Neve, L.L.; Giammanco, M. **2008**. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem.* 111: 45–49.

Makris D. P., Boskou G., Andrikopoulos N. K., Kefalas P. **2008**. Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 1075–1079.

Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. **2007**. Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* 1: 7-18.

Mane C., Souquet J. M., Olle D., Verrie C.S, Veran F., Mazerolles G., Cheynier V., Fulcrand H. 2007. Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7224-7233.

Marais J. **1983**. Terpenes in the aroma of grapes: a review. *South African Jour. of Enology & Viticulture* 4: 49-60.

Marais J. **1994**. Sauvignon blanc cultivar aroma — a review. *South African Jour. of Enology & Viticulture* 15: 41-45.

Marais J., van Wyk C. J., Rapp A. **1991**. Carotenoid levels in maturing grapes as affected by climatic regions, sunlight and shade. *South African Journal of Enology & Viticulture* 12: 64-69.

Marigheto N. A., Kemsley E. K., Defernez M., Wilson R. H. **1998**. A Comparison of Mid-Infrared and Raman Spectroscopies for the Authentication of Edible Oils, *Journal of the American oil chemists' society*, 75: 987-992.

Martinello M., Hecker G., Pramparo M. C. **2007**. Grape seed oil deacidification by molecular distillation: analysis of operative variables influence using the response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 81: 60–64.

Matthews J. **1959**. The Vitamin B-Complex Content of Bottled Swis Grape Juices. *Vitis* 2: 57-64.

Mayes P. A. **1983**. Metabolism of Lipid en Fatty Acids Harper's Review of Biochemistry. Medical Pub. Inc., California.

Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B., Ewert B. **1999**. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and PinotNoirwines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4009–4017.

McGovern P. E. **1995**. The origins and ancient history of wine, Gordon and Breach, Amsterdam.

Mendes-Pinto M. M. **2009**. Carotenoid breakdown products the–norisoprenoids–in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 236-245.

Meyer A. S., Yi O. S., Pearson D. A., Waterhouse A. L., Frankel E. N. **1997**. Inhibition of human lowdensity lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 45: 1638–1643.

Mielnik M. B., Olsen E., Vogt G., Adeline D., Skrede G. **2006**. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat, *LWT- Food Science and Technology* 39: 191-198.

Mikstacka R., Rimando A. M., Ignatowicz E. **2010**. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods Hum Nutr.* 65: 57–63.

Mironeasa S., Leahu A., Codina G. G., Stroe S. G., Mironeasa C. **2010**. Grape seed: physicochemical, structural characteristic and oil content, *Journal of Agroalimentary Process and Technologies* 16: 1-6.

Monagas M., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Laureano O., Ricardo da Silva J. M. **2003**. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6475-6481.

Monagas M., Hernandez-Ledesma B., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. **2006**. Comercial Dietary Ingredients from *Vitis vinifera* L. Leaves and Grape Skins: Antioxidant and Chemical Characterization. *J. Agric. Food Chem.* 54: 319–327.

Monagas M., Hernandez-Ledesma B., Garrido P., Martin-Alvarez P. J., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. **2005**. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutr Cancer.* 53: 244–254.

Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K. **2007**. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* 58: 1935-1945.

Mori K., Sugaya S., Gemma H. **2004**. Regulatory mechanism of anthocyanin biosynthesis in Kyoho grape berries grown under different temperature conditions. *Environ. Control in Biol.* 42: 21-30.

Munoz N. C., Alonso S. G., Romero E. G., Gutieärrez I. H. **2007**. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* 55: 992-1002.

Munoz-Espada A., Wood K., Bordelon B., Watkins B. **2004**. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton and Marechal Foch grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6779-6786.

Murga R., Ruiz R., Beltran S., Cabezas J. L. **2000**. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3408-3412.

Núñez V., Monagas M., Gomez-Cordovés M. C., Bartolomé B. **2004**. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol. Tec.* 31: 69-79.

Obreque-Slier E., Pena-Neira A., Lopez-Solis R., Zamora-Marin F., Ricardo-da Silva J. M., Laureano O. **2010**. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3591-3599.

O'Donnell S., Demshemino I., Yahaya M., Nwadike I., Okoro L. 2013. A review on the Spectroscopic Analyses of Biodiesel. *European International Journal of Science and Technology.* 2 (7):137-146.

Ohnishi M., Hirose S., Kawaguchi M., Ito S., Fujinot Y. **1990**. Chemical Composition of Lipids, Especially Triacylglycerol, in Grape Seeds. *Agric. Bioi. Chem.* 54 (4):1035-1042.

O-Marques J., Reguinga R., Laureano O., Ricardo-da Silva J. M. **2005**. Changes in grape seed, skin and pulp condensed tannins during berry ripening: Effect of fruit pruning. *Ciencia Tec. Vitiv.* 20: 35-52.

Orhan D. D., Orhan N., Ozcelik B., Ergun F. **2009**. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves, *Turk. J. Biol.* 33, doi: 10.3906/biy-0806-17.

Ozen B. F., Mauer L. J. **2002**. Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 3898-3901.

Özkan G., Sagdıç O., Baydar N. G., Kurumahmutoglu Z. **2004**. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1807–1811.

Pacifico S., D'Abrosca B., Scognamiglio M., Gallicchio M., Galasso S., Monaco P., Fiorentino A. **2013**. Antioxidant Polyphenolic Constituents of *Vitis* × *Labruscana* cv. 'Isabella' Leaves. *The Open Natural Products J.* 6: 5-11.

Palma M., Taylor L. T., Varela R. M., Cutler S. J., Cutler H. G. **1999**. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *J. Agric. Food Chem.* 47: 5044-8.

Panico A. M., Cardile V., Avondo S., Garufi F., Gentile B., Puglia C., Bonina F., Santagati N. A., Ronsisvalle G. **2006**. The in vitro effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine* 13: 522–526.

Pari L., Suresh N. **2009**. Effect of grape (*Vitis vinifera* L) leaf extract on alcohol induced rat toxicity. In: *Advanced in Phytotherapy research*, Eddokuks, M. (ed.), Kerala, India: Research Signpost Trivandrum, pp. 45-57.

Park S. K., Morrison J. C., Adams D. O., Noble A. C. **1991**. Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem.* 39: 514-518.

Park S. Y., Bok S. H., Jeon S. M., Park Y. B., Lee S. J., Jeong T. S., Choi M. S. **2002**. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr. Res.* 22: 283–95.

Pastrana-Bonilla E., Akoh C. C., Sellappan S., Krewer G. **2003**. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5497–4503.

Pezet R., Perret C., Jean-Denis J. B., Tabacchi R., Gindro K., Viret O. **2003**. δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5488-5492.

Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J., Nunez M. J. **2005**. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur. Food Res. Technol.* 221: 284–290.

Ponomarev V. D. 1976. *Ekstragirovanje lekarstvennogo syr'ya*. Medicina. Moscow.

Possner D. R. E., Kliewer W. M. **1985**. The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 229-240.

Prior R. L., Hoang H., Gu L. W., Wu X. L., Bacchiocca M., Huang D. J., Ou B. X., Jacob R. **2003**. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3273–3279.

Qian Y. P., Cai Y. J., Fan G. J., Wei Q. Y., Yang J., Zheng L. F., Li X. Z., Fang J. G., Zhou B. **2009**. Antioxidant-based lead discovery for cancer chemoprevention: the case of resveratrol. *J. Med. Chem.* 52: 1963–1974.

Radovanovic A., Radovanovic B., Jovancevic B. **2009**. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem.* 117: 326–331.

Radovanović B. C., Radovanović A. N., Souquet J-M. **2010**. Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2455–2461.

Ratsch C. **1998**. *Enzyklpedie der psychoaktiven Pflanzen*, WVG, Stuttgart.

Razungles A., Bayonove C. L., Cordonnier R. E., Sapis J. C. **1988**. Grape carotenoids: Changes during the maturation period and localization in mature berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 44-48.

Revilla E., Ryan J. M. **2000**. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J. Chromatogr. A* 881: 461-469.

Revilla E., Ryan J. M., Martín-Ortega G. **1998**. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4592-4597.

Riberéau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P. **1989**. *Tratado de enología. Ciencias y técnicas del vino. Volume II. Characters de los vinos. Madración de la uva. Levaduras y bacterias*. Spanish translation. Argentina: Hemisferio Sur.

Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovsek U., Mattivi F. **2000**. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1996-2002.

Ristic R., Iland P. G. **2005**. Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 43-58.

Robinson S. P., Davies C. **2000**. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6(2): 168-174.

Rohman A., Che Man Y. B. **2009**. Monitoring of virgin coconut oil (VCO) adulteration with palm oil using fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of food lipids* 16: 618-628.

Romeyer F. M., Macheix J. J., Goiffon J. P., Reminiac C. C., Sapis J. C. **1983**. The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Jour. of Agricultural & Food Chemistry* 31: 346-349.

Rostagno M. A., Palma M., Barroso C. G. **2003**. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A.* 1012(2): 119-28.

Rotava R., Zanella I., da Silva L. P., Manfron M. P., Ceron C. S., Alves S. H., Karkow A. K., Santos J. P. A. **2009**. Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by-product. *Cienc. Rural.* 39: 941–944.

Rubilar M., Pinelo M., Shene C., Sineiro J., Nunez M. J. **2007**. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10101–10109.

Ryan J. M., Revilla E. **2003**. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3372-3378.

Saenz-Lopez R., Fernandez-Zurbano P., Tena M. T. **2003**. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *J. Chromatogr. A.* 990: 247-258.

Sato M., Ramarathnam N., Suzuki Y., Ohkubo T., Takeuchi M., Ochi H. **1996**. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44: 37–41.

Serra A., Macia A., Romero M. P., Salvado M. J., Bustos M., Fernandez-Larrea J., Motilva M. J. **2009**. Determination of procyanidins and their metabolites in plasma samples by improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 877: 1169–1176.

Shukitt-Hale B., Carey A., Simon L., Mark D. A., Joseph J. A. **2006**. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 22: 295–302.

Singletary K. W., Stansbury M. J., Giusti, M., Breemen R. B. V., Wallig M., Rimando A. **2003**. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7280–7286.

Singleton V. L., Rossi J. A. Jr. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

Stiaccini G., Mannari C., Bertelli A. A. E., Giovannini L. **2012**. Resveratrol-poor red wines modulate SIRT1 in human renal cells. *Plant Foods Hum Nutr.* 67: 289–293.

Somers T. C., Evans M. E. **1976**. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “Chemical Age”. *J. Sci. Food Agric.* 28: 279-287.

Soobrattee M. A., Neergheena V. S., Luximon-Rammaa A., Aruomab O. I., Bahoruna, T. **2005**. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 579: 200–213.

Souquet J. M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M. **1996**. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43: 509-512.

Souquet J.M., B. Labarbe, C.L. Guerneve, V. Cheynier, M. Moutounet, Phenolic Composition of Grape Stems. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1076-1080, (2000).

Spigno G., De Faveri D. M. **2007**. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Engineering.* 78: 793-801.

Spranger I., Sun B., Mateus A. M., de Freitas V., Ricardo-da-Silva J. M. **2008**. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 108: 519–532.

Steytler D. in Grandison A., Lewis M. (Editors), *Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and applications*, Woodhead Publishing Limited Cambridge, **1996**, p. 17.

Stines A.P., Grubb J., Gockowiak H., Henschke P. A., Hoj P. B., van Heeswijck R. **2000**. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6:150-158.

Sun B. S., Ricardo-da Silva J. M., Spranger M. J. **2001**. Quantification of catechin and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciencia Tec. Vitiv.* 16: 23-24.

Sun B., Ribes A. M., Leandro M. C., Belchio A. P., Spranger M. I. **2006**. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal Chim Acta* 563: 382–390.

Tarara J. M., Lee J., Spayd S. E., Scagel C. F. **2008**. Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 3.

Terra X., Montagut G., Bustos M., Llopiz N., Ardevol A., Blade C., Fernandez-Larrea J., Pujadas G., Salvado J., Arola L. **2009**. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 20: 210–218.

Terrill T. H., Rowan A. M., Douglas G. B., Barry T. N. **1992**. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58: 321-329.

Thimothe J., Bonsi I.A., Padilla-Zakour O. I. **2007**. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis Interspecific Hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10200–10207.

Tsanga C., Higgins S., Duthie G. G., Duthie S. J., Howie M., Mullen W., Leana M. E. J., Crozier A. **2005**. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 93: 233–240.

Veverka L., Jelínková M., Hron K., Balík J., Stávek J., Barták P. **2012**. Chemical Markers in the Aroma Profiles of South Moravian Red Wine Distillates. *Czech J. Food Sci.* 30(4): 369–376.

Vujičić Đ., Comić D., Zarubica A., Micić R., Bosković G. **2010**. *Fuel.* 89: 2054-2061.

Wang C. C., Chu, C. Y., Chu, K. O., Choy, K. W., Khaw, K. S., Rogers M. S., Pang C. P. **2004**. Trolox equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinic. Chem.* 50: 952–954.

Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y., Li X. **2008**. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106: 804-810.

Waterman P., Mole S. **1994**. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Wilson B., Strauss C. R., Williams P. J. **1984**. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *Jour. of Agricultural & Food Chemistry* 32: 919-924.

Winkel-Shirley B. **2001**. It takes a Garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiol.* 127:1399-1404.

Xia E-Q., Deng G-F., Guo Y-J., Li H-B. **2010**. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 622-646.

Xie D. Y., Sharma S. B., Paiva N. L., Ferreira D., Dixon R. A. **2003**. Role of anthocyanidins reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299: 396-399.

Yi C., Shi J., Kramer, J., Xue S., Jiang Y., Zhang M., Ma Y., Pohorly J. **2009**. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder, *Food Chemistry* 114: 570–576.

Yigit D., Yigit N., Mavi A., Yildirim A., Guleryuz M. **2009**. Antioxidant and antimicrobial activities of methanol and water extracts of fruits, leaves and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Karaerik. *Asian J. Chem.* 21: 183–194.

Yilmaz Y., Toledo R. T. **2004**. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52: 255–260.

Yoshimura Y., Nakazawa H., Yamaguchi F. **2003**. Valuation of the NO scavenging activity of procyanidin in grape seed by use of the TMA-PTIO/NOC 7 ESR system. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6409–6412.

Zamora R., Alba V., Hidalgo F. J. **2001**. Use of High-Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Screening of Virgin Olive Oils, *Journal of the American oil chemists' society* 78: 89-94.

Zhu L., Zhang Y., Lu J. **2012**. Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 3492-3510.

7. IZVOD

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su dve ekstrakcione tehnike: konvencionalna i ultrazvučna za dobijanje biološki aktivnih fenolnih jedinjenja iz grožđa i sporednih proizvoda vinove loze autohtone sorte Vranac i introdukovane sorte Merlo. Utvrđeni su optimalni uslovi ekstrakcije za obe tehnike (sistem rastvarača: metanol/acetone/voda/mravlja kiselina u odnosu 30/40/29,5/0,5; temperatura 40 °C; odnos rastvarač/biljni materijal 58-60 mL/g; vreme trajanja ekstrakcije 60 min kod konvencionalne i 15 min kod ultrazvučne) i uspostavljena je međusobna korelacija, sa kojom je utvrđena prednost primene ultrazvučne ekstrakcije. Određen je sadržaj i koncentracija fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima, primenom UV-Vis spektroskopskim metodama i HPLC analizom. Takođe, primenom DPPH testa ispitana je antioksidativna aktivnost, a primenom mikrodilucione metode, antimikrobna aktivnost dobijenih ekstrakata. Dobijeni eksperimentalni rezultati upoređivani su pomoću odgovarajućih statističkih softverskih paketa. Analize su potvrdile raznolik i bogat sadržaj fenolnih jedinjenja svih delova vinove loze (grožđa, lista, peteljke) i sporednih proizvoda prerade grožđa (komine). U ispitivanim sortama identifikovane su različite grupe fenolnih jedinjenja, a najzastupljenije su fenolne kiseline (pokožica, list, peteljka i komina), flavan-3-oli (semenka, peteljka, pokožica i komina), proantocijanidini (semenka, peteljka, pokožica i komina), flavonoli (list, peteljka, pokožica i komina), antocijani (pokožica i komina) i stilbeni (list). Takođe, utvrđeno je da listovi loze Vranca inficirani plamenjačom vinove loze (*Plasmopara viticola*) sadrže povećanu koncentraciju fitoaleksina – stilbena za 45,60% u poređenju sa ekstraktima dobijenim od zdravih listova loze. Utvrđena je jaka korelacija između antioksidativne aktivnosti i fenolnog sadržaja ispitivanih ekstrakata. Ustanovljena je i značajna aktivnost prema 12 patogenih bakterija i jednog patogenog kvasca, naročito ekstrakti bogatiji stilbenima su pokazali veću antimikrobnu aktivnost. Gram (-) bakterije i kvasac pokazale su veću rezistenciju na ove ekstrakte od gram (+) bakterijskih sojeva.

Ispirivana je primena otpadnog biomaterijala nastalog u toku procesa preade grožđa. Ekstrakcijom sa heksanom kao rastvaračem dobijeno je bio ulje, i to iz komine 11,08% , a iz semenke do 19,78%. GC-MS analizom utvrđeno je da ova ulja sadrže od 86,8 do 88% nezasićenih masnih kiselina što ih čini pogodnim za ljudsku ishranu. Sa ciljem dalje primene izvršena je konverzija dobijenog bio ulja u biodizel primenom procesa transesterifikacije. Analizom ¹H NMR spektara uvrđeno je da se upotrebom kalcinisanog (na 700 °C) heterogenog katalizatora na bazi CaO pri molarnom odnosu reaktanata u korist metanola (1 : 15 = ulje iz semenke komine : metanol) dobija potpuna konverzija (100%) ulja semenci u biodizel.

Na osnovu gore navedenog potvrđeno je da svi delovi vinove loze, kao i sporedni proizvodi prerade grožđa sadrže bioaktivna fenolna jedinjenja i mogu se iskoristiti za dobijanje ekstrakata bogatih fenolima. Semenke komine i komina bogate su biljnim uljima, i mogu se upotrebiti za dobijanje jestivog ulja i biodizela. Vinova loza može naći primenu u industriji hrane, farmaciji ili energetici.

8. SUMMARY

In this doctoral dissertation two extraction techniques: conventional and ultrasound was applied to obtain biologically active phenolic compounds in grapes and grapes by-products of two varieties native Vranac and introduced Merlo. Optimal extraction conditions for both techniques (a solvent system of methanol/acetone/water/formic acid in relation to 30/40/29.5/0.5; temperature of 40 °C; the solvent/plant material ratio of 58-60 mL/g , duration 60 min for conventional and 15 minutes for ultrasound extraction) are determined and established a mutual correlation, which confirmed the advantage of the ultrasonic extraction usage. The content and concentration of phenolic compounds in the extracts were determined by using UV-Vis spectroscopy methods and HPLC analysis. The antioxidant activity was tested by using DPPH assay and the antimicrobial activity of these extracts by using microdilution method. The experimental results were compared using appropriate statistical software packages. Analysis confirmed the diverse and rich content of phenolic compounds of all parts of the vine (grapes leaves, stems) and grape by-products (pomace). In the tested cultivars we identified the different groups are phenolic compounds, and the most common are phenolic acids (skin, leaf, stems and pomace), flavan-3-ols (seed, stems, skin and pomace), proanthocyanidins (seed, stems, skin and pomace), flavonols (leaf, stems, skin and pomace), anthocyanins (skin and pomace) and stilbenes (leaf). It was also established that grapevine leaves infected by downy mildew (*Plasmopara viticola*) containing higher concentration of stilbenes (for 45.60% higher than extracts obtained from healthy grapevine leaves). There was a strong correlation between antioxidant activity and phenolic contents of investigated extracts. It also introduces significant activity against 12 pathogenic bacteria and yeast, especially, extracts rich in stilbenes showed higher antimicrobial activity. Gram (-) bacteria and yeast showed stronger resistance than gram (+) bacterial strains.

The application of biomaterials waste generated during the process of grapes was investigated. Extraction with hexane as the solvent was performed to obtain bio-oil, and that 11.08% from pomace and 19.78% from pomace seeds. The GC-MS analysis showed that these oils contain from 86.8 to 88% unsaturated fatty acids which makes them suitable for human consumption. The conversion of bio-oils into biodiesel was obtained by using transesterification process. It was observed by ¹H NMR analyses of spectras that the use of a heterogeneous catalyst based on CaO (activated at 700 °C) in a reagent molar ratio (1: 15 = pomace seed oil: methanol) gives complete conversion (100%) of a seed oil into the biodiesel.

Based on the above it is confirmed that all parts of the vine, as well as grape by-products contain bioactive phenolic compounds and can be used to obtain phenols rich extracts. Seeds and pomace are rich in bio-oils and can be used for preparation of edible oils and biodiesel. Grapevines can be applied in the industry of foods, pharmaceuticals or energy.

9. BIOGRAFIJA

Marko Anđelković rođen je 9 septembra 1978. Godine u Leskovcu. Završio je osnovnu školu „Kosta Stamenković” i gimnaziju „Stanimir Veljković-Zele” u Leskovcu sa odličnim uspehom. Diplomске akademske studije je završio 2003. godine i odbranom diplomskog rada pod nazivom „Uticaj selektivnosti katalizatora na mehaničke osobine vodenih dvokomponentnih poliuretanskih premaza“, stekao zvanje diplomirani inženjer tehnologije-organsko hemijske tehnologije i polimernog inženjerstva.

Specijalističke akademske studije na Departmantu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu upisao je 2008. godine. Specijalistički rad na temu „Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i njihove antioksidativne aktivnosti u nekim sortama grožđa“, odbranio je 2010. godine i stekao zvanje diplomirani hemičar - specijalista.

Doktorske studije je upisao 2010/11. Godine na Departmantu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Položio je sve ispite predviđene studijskim programom za doktorske studije.

U novembru 2011.godine boravio je na stručnom usavršavanju na Hemijskom fakultetu u Lajpcigu, Nemačka u organizaciji DAAD projekta, gde je radio deo eksperimentalnog rada doktorske disertacije.

Od 2005. godine radi u Centru ABHO, Vojske Srbije u laboratoriji i kao nastavnik stručnih predmeta u Centru ABHO .

10. BIBLIOGRAFIJA

Рад у врхунском међународном часопису са SCI листе (M₂₁):

1. **M. Anđelković**, B. Radovanović, A Milenkovic Anđelković, V Radovanović. Phenolic Compounds and Bioactivity of Healthy and Infected Grapevine Leaf Extracts from Red Varieties Merlot and Vranac (*Vitis vinifera* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 70/3: 317-323 (2015).

Рад у међународном часопису са SCI листе (M₂₃):

2. **M. Z. Anđelkovic**, A. S. Milenkovic Anđelkovic, B. C. Radovanovic, A. N. Radovanovic. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenols From Seeds of Grape Pomace. *Acta Chimica. Slovenica*. 61: 858–865 (2014).

3. A. S. Milenković-Anđelković., **M. Z. Anđelković**, A. N. Radovanović, B. C. Radova-nović, V. Nikolić. Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hemijska industrija* 69 (4): 331–337 (2015).

4. **M. Anđelkovic**, B. Radovanovic, A. Radovanovic, A. Milenković Anđelkovic. Changes in Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grapes cv Vranac During Ripening. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34/2: 147-155 (2013).

5. B.C. Radovanović, A.S. Milenković Anđelković, A.B. Radovanović, **M.Z. Anđelković**. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12 (5): 813-819 (2013).

Рад саопштен на скуповима међународног значаја штампан у целини (М33):

6. B.C. Radovanović, **M. Andjelković**, A. Radovanović, M.N. Mitić, Determination of polyphenolic composition and antioxidant activity of grape Vranac during ripening, XXVth International Conference on Polyphenols-Polyphenols Communications. Vol. 2: 602-603, 2010, Montpellier, France.
7. B. Radovanovic, **M. Andjelkovic**, A. Radovanovic, Influence of extraction methods on the polyphenolic content and antioxidant activity of grape Vranac, XV Savetovanje o biotehnologiji .811-816, 2010 god., Čačak, Serbia.
8. D. Nikolić, A. Milenković Anđelković, **M. Anđelković**, Preparation for cooling and freezing of food raw materials in the cold storage Poljoprodukt, , 1stInternational scientific conference on economic and regional development “EUROBRAND“, 475-483, 2010 god., Veliko Gradište - Srebrno jezero, Serbia.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34):

9. **M. Andjelkovic**, B. Radovanovic, Determination of UV-effects on antioxidant activity of Vranac grape extracts”, Workshop “From Molecules to Functionalised Materials, 16 th – 20 th March 2011., Skoplje, Republic of Macedonia.
10. B. Radovanovic, A. Milenkovic-Andjelkovic, A. Radovanovic, **M. Andjelkovic**, V. Randjelovic. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activity of *Comus mas* Land *Rosa canina* L. berry fruit leaves grown in southeast Serbia. XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 8-11 October 2014, Metropol Lake Resort, Ohrid, Republic of Macedonia.

11. B. Radovanovic, **M. Andjelkovic**, A.Milenkovic-Andjelkovic, V. Radovanovic, S. Dekic. Effect of ultrasound assisted extraction of the seed phenol content from Vranac (*Vitis Vinifera* L.) grape marc grown in southeast Serbia. XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 8-11 October 2014, Metropol Lake Resort, Ohrid, Republic of Macedonia.

Рад у научном часопису (M₅₃):

12. A. Milenković Anđelković, D. Nikolić, **M. Anđelković**. Investigation ecological condition and water quality of lake Čelije. Euroinvent. 1 (1): 88-93 (2010).

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M₆₄):

13. B. Radovanovic, **M. Andjelkovic**, D. Markovic. The determination of UV-effect on the antioxidant activity of Vranac grape seed extracts, IX symposium “Novel technologies and economic development”, 21-22.10. 2011 god, Leskovac, Serbia.

11. IZJAVE AUTORA



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Оптимизација екстракције и карактеризација фенолних једињења и био уља из сорти Вранац и Мерло

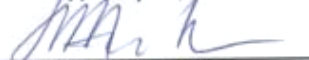
(*Vitis Vinifera* L.) и њихова потенцијална примена

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 06. 11. 2015

Аутор дисертације:
Марко Анђелковић

Потпис докторанда:





Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Марко Анђелковић

Студијски програм:

Хемија

Наслов рада: Оптимизација екстракције и карактеризација фенолних једињења и био уља из сорти Вранац и Мерло (*Vitis Vinifera L.*) и њихова потенцијална примена

Ментор:

др Блага Радовановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 06.11.2015

Аутор дисертације:

Марко Анђелковић

Потпис докторанда:





Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Оптимизација екстракције и карактеризација фенолних једињења и био уља из сорти Вранац и Мерло (*Vitis Vinifera L.*) и њихова потенцијална примена која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 06.11.2015

Аутор дисертације:
Марко Анђелковић

Потпис докторанда:

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BYNC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).